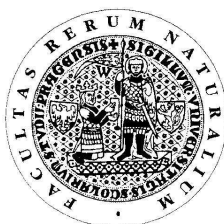


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Martina Havlíková

ANALÝZA POLYFENOLICKÝCH LÁTEK VE VÍNECH POCHÁZEJÍCÍCH Z KAVKAZU

Analysis of polyphenolic compounds in wines from
the Caucasus

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a díky projektu MŠMT LD11005.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. května 2012

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc.; Mgr. Petru Maršíkovi, Ph.D. a Ing. Přemyslovi Landovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování této bakalářské práce.

Dále děkuji Laboratoři rostlinných biotechnologií v Ústavu experimentální botaniky Akademie věd v Praze za umožnění práce na projektu „Sledování diversity révy vinné na základě produkce zdraví prospěšných látek“, který byl financován z projektu MŠMT LD11005.

Klíčová slova

červené víno, HPLC analýza, UV-vis spektroskopie, fenolické látky, gruzínská vína, PCA analýza, shluková analýza

Keywords

red wine, HPLC analysis, UV-vis spectroscopy, phenolic compounds, Georgian wines, PCA analysis, cluster analysis

Obsah

1. ÚVOD	- 7 -
2. TEORETICKÝ ÚVOD	- 8 -
2.1 VÍNO.....	- 8 -
2.1.1 Historie	- 8 -
2.1.2 Charakteristika vína	- 9 -
2.1.3 Výroba červeného vína	- 9 -
2.1.4 Oblasti pěstování.....	- 10 -
2.1.5 Odrůdy.....	- 11 -
2.1.6 Vliv na zdraví.....	- 12 -
2.2 BIOLOGICKY VÝZNAMNÉ LÁTKY VE VÍNĚ	- 13 -
2.2.1 Fenolické kyseliny	- 13 -
2.2.2 Flavonoidy.....	- 15 -
2.2.3 Stilbeny	- 17 -
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 18 -
3.1 MATERIÁL	- 18 -
3.1.1 Vína:	- 18 -
3.1.2 Standardy:	- 18 -
3.1.3 Ostatní chemikálie:.....	- 18 -
3.2 ZAŘÍZENÍ	- 19 -
3.3 PŘÍPRAVA STANDARDŮ	- 19 -
3.4 EXTRAKCE LÁTEK Z VÍNA	- 20 -
3.5 HPLC ANALÝZA.....	- 20 -
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	- 22 -
4.1 PŘÍPRAVA VZORKU	- 22 -
4.2 OPTIMALIZACE HPLC ANALÝZY	- 22 -
4.3 OBSAH FENOLICKÝCH LÁTEK V ČERVENÝCH VÍNECH	- 23 -
4.4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	- 29 -
5. ZÁVĚR.....	- 33 -
6. LITERATURA	- 34 -
PŘÍLOHY	A

Seznam zkratk a symbolů

C18	oktadecyl
GC	plynová chromatografie
HDL	„High-Density Lipoprotein“ – vysokodenzitní lipoprotein
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LDL	„Low-Density Lipoprotein“ – nízkodenzitní lipoprotein
MS	hmotnostní spektrometrie
ND	nedetekováno
PCA	„Principal Component Analysis“ – analýza hlavních komponent
PFP	pentafluorfenyl
R²	koeficient determinace
SPE	extrakce na pevné fázi
UV	ultrafialové záření

1. Úvod

Vinná réva je již po staletí využívána lidmi a to nejen jako potravina či surovina k výrobě nápojů, ale i jako lék či alespoň jako prevence proti různým infekcím a nemocem. V dnešní době je víno též důležitým zemědělským produktem a následně vývozním artiklem a ovlivňuje tedy i ekonomiku. Proto se čím dál tím více pozornosti věnuje chemickému složení vína, které úzce souvisí s jeho kvalitou, chutí a dalšími vlastnostmi. Analýzou sice nelze prokázat přímý biologický účinek jednotlivých složek vína (jako např. synergie antioxidantních vlastností jednotlivých látek), ale jsme schopni stanovit rozdíly v jejich obsahu u různých odrůd. Pro mnoho výrobců vína je tato kvantitativní informace důležitá a často se snaží jeho složení ovlivnit technologickým postupem při zpracování tak, aby výsledný produkt byl co nejkvalitnější.

Z lékařského hlediska je významný také vliv vína na metabolismus a zdraví člověka. Z tohoto důvodu se v posledních letech stále více výzkumných projektů zaměřuje na antioxidantní či protizánětlivou aktivitu jednotlivých odrůd vín. Na základě těchto výzkumů došlo k rozšíření využití vinných extraktů kromě potravinářství i do dalších průmyslových odvětví (např. jsou přidávány do kosmetických produktů). Víno je tedy nenahraditelným přírodním produktem, který je vhodný pro další výzkum především pro jeho předpokládané léčivé vlastnosti. Odrůdy vinné révy pocházející ze zemí jako je Gruzie mají potenciál odlišovat se od ostatních nejen díky příznivým klimatickým podmínkám pro jejich pěstování ale i díky tradičním postupům jejich zpracování.

Tato práce je součástí projektu „Sledování diversity révy vinné na základě produkce zdraví prospěšných látek“, jehož cílem je porovnat biologickou aktivitu a chemické složení vín pocházejících z Kavkazu s odrůdami pěstovanými v ostatních částech Evropy. Cílem mé práce bylo tedy vyvinout vhodnou analytickou metodu pro stanovení co největšího množství potenciálně aktivních látek ve vzorcích vína a následně porovnat chemické složení červených vín pěstovaných a vyrobených na Kavkaze s víny vyprodukovanými v České republice.

2. Teoretický úvod

2.1 Víno

2.1.1 Historie

Již první starověké civilizace vyráběly z plodů vinné révy nápoje a používaly je i k léčbě některých onemocnění. Z dochovaných písemných památek lze například zjistit, že staří Egypťané víno pili rádi, ale už nejsme schopni říci, jak jej vyráběli. Fénicičané a následně Řekové rozšířili tento nápoj do oblastí, kde se v dnešní době nachází nejvíce vinic a to do Itálie, Francie a Španělska. Řekové víno milovali, jak je zřejmé z řady oslavných básní (např. anakreontik). Co se týče přípravy vína, tak do nápoje přidávali různé bylinky, med nebo dokonce mořskou vodu. Římané už víno připravovali jinak a docílili toho, že mělo i větší životnost. Zaměřovali se tedy především na zdokonalení postupů při pěstování vinné révy a výrobě vína. Často nápoj koncentrovali svářením a následně ho udili nad ohněm, výsledný produkt se poté přechovával v hliněných amforách nikoli v sudech [1-3].

Ve středověku měly nejdůležitější postavení při produkci vína kláštery, zejména pro vylepšování postupů a šíření vinařské kultury. Vznik pro nás tzv. klasických vín však spadá až do 17. století. Hlavním důvodem bylo, že v této době byla vynalezena láhev ze skla a následně se začaly používat i korkové špunty. Do té doby se víno skladovalo pouze v sudech a nevydrželo tak dlouho. I přes to bylo víno do počátku 17. století jediným nápojem, který nebyl na rozdíl od vody spojen se zdravotními riziky [1].

V druhé polovině 19. století začal velký rozmach v exportu vína. Když pak bylo díky Pasteurovi objasněno kvašení, mohli vinaři začít kontrolovat procesy v průběhu jeho výroby. Největších úspěchů dosahovali vinaři v osmdesátých letech 20. století, kdy spotřeba vína po celém světě masově stoupala. Dnes už je ale díky moderním technologiím a postupům dobrého vína přebytek [1]. To nutí dnešní vinaře vracet se k odrudám, které nejvíce vyhovují specifickým místním podmínkám, aby mohli spotřebitelům nabídnout něco exkluzivního. Tato ekonomická situace bude tedy možná příznivá právě pro producenty lokálních druhů vín, jako jsou např. gruzínské vinaři. Gruzie má z tohoto hlediska vysoký potenciál: réva se zde pěstuje již 5000 let a vyšlechtilo se tu na 500 odrůd. Vědci se domnívají, že právě zde se zrodilo vinařství. Vždyť pravděpodobně i slovo víno pochází z gruzínského výrazu „gvino“ [2].

2.1.2 Charakteristika vína

Víno je z chemického hlediska velice složitá směs látek, která je značně ovlivněna původem, podmínkami růstu, zpracováním a následným zráním produktu [4]. Největší podíl na objemu vína má voda, tvoří přes 80 % jeho obsahu. Další majoritní složkou vína je ethanol, kterého bývá ve vínech 11 – 15 % objemu. Ten je důležitý při výrobě, kde mimo jiné slouží jako rozpouštědlo pro extrakci některých významných látek z rostlinného materiálu a z prostředí, ve kterém víno zraje (sudy, hliněné amfory apod.) [5]. Samotný ethanol je též zkoumán pro své zdraví prospěšné účinky. Podle některých studií je to právě ethanol, který způsobuje, že víno je považováno za lék. Příznivě ovlivňuje zejména kardiovaskulární systém [2]. Další významné složky, které se ve větším množství nachází ve všech vínech, jsou cukry a to monosacharidy (např. glukosa, fruktosa, arabinosa, xylosa) i oligosacharidy (např. sacharosa). Dále je to glycerol, který určuje viskozitu vína. Charakteristickou chuť, vůni a další vlastnosti vína však ovlivňují i látky obsažené v podstatně menším množství. Jsou to volné organické a i anorganické kyseliny jako je kyselina vinná, jablečná či mléčná a některé fenolické kyseliny či jejich estery. Dále jsou ve víně přítomny významné polyfenolické látky, jako jsou flavonoidy a nebo stilbeny. Zastoupení obsahových složek se v průběhu stárnutí vína mění a to zejména obsah taninů neboli tříslovin, takže dochází ke změnám barvy vína a i jeho chuti, protože taniny ovlivňují zejména trpkost vína [5,6].

2.1.3 Výroba červeného vína

Při výrobě kvalitních červených vín se hrozny sklízí ručně, aby se zabránilo případnému rozmačkání bobulí. Hrozny se poté na třídičce kontrolují a odstraňují se bobule, které jsou nahnílé, rozmačkané či nezralé. Hrozny se následně v mlýnku či odzrňovači rozmačkají. Při odzrnutí se dle odrůdy odstraní z hroznů třapiny či se jich část ponechá, nesmí však dojít k porušení peciček v bobulích. Vzniklý mošt se přečerpá i se slupkami do kádě buď kovové, plastové nebo dřevěné a nechá se volně na vzduchu kvasit. Dle zvyklostí sklepmistra se směs může chladit či zahřívat, čímž se ovlivňuje rychlost kvašení. Při tomto procesu vzniká tzv. rmutový klobouk chránící směs před oxidací. Jedná se o slupky vína, které jsou díky vznikajícímu oxidu uhličitému nadnášeny na hladině. Je nutné nenechat tento klobouk vyschnout, proto se směs musí promíchávat. Když proběhne alkoholové kvašení, je víno lisováno a odkalováno. Někdy

se odděluje víno vzniklé před lisováním (tzv. samotok), od toho, co se pak získá lisováním a které je mnohem bohatší na třísloviny. Následuje zrání vína v dubových sudech popřípadě nerezových nádobách. Během zrání je třeba víno v sudech doplňovat, protože se odpařuje, a někdy se i stáčí do nového sudu, aby se očistilo od usazenin. Zároveň probíhá školení vína, tedy odkalování, čiření, síření oxidem siřičitým, aby se bránilo oxidaci, a další procesy, které připraví víno na stáčení do lahví. Lahve se pak uloží do ležáckých boxů a nechají se, aby dospěly do určité lahvové zralosti [1,6,7].

V Gruzii se ještě místy dodržují archaické způsoby výroby vína. Víno zde nechávají kvasit v hliněných amforách se špičatým dnem, které jsou zapuštěné až po okraj do země a nazývají se *kwevri* (Obr. 2.1). V těchto nádobách se nechávají kvasit celé hrozny včetně stopek. Víno se nechává kvasit až do doby, dokud nenastane nějaká



významná událost (např. svatba či jiná oslava), při které se víno spotřebuje. Takto vzniklé víno je pak velice bohaté na třísloviny a nevydrží tak dlouho jako průmyslově vyráběné víno. V Gruzii existují dva postupy na výrobu vína v těchto amforách lišící se podle dané vinařské oblasti [1,8].

Obrázek 2.1 Nádoby na kvašení vína zvané *kwevri* [8]

2.1.4 Oblasti pěstování

Nejvýznamnější pěstitelské oblasti se nacházejí v Evropě a vévodí jim Francie, Itálie a Španělsko. Podle statistik z roku 2004 je Francie největším producentem vína na světě. Nejvyšší konzumací, tedy největší spotřebou vína na osobu, se může pochlubit Lucembursko a těsně za ním následuje opět Francie. V Asii a především v Číně narůstá mnohonásobně počet vinic, avšak při hodnocení těchto statistik je na místě opatrnost, protože zahrnují nejen klasické vinaře, ale i výrobce hroznů. Velkého rozmachu dosáhla v posledních letech též produkce vína v Austrálii, Chile, Argentině, Jihoafrické republice a USA. Vzhledem ke klimatickým změnám a stále dokonalejším postupům při pěstování révy je skoro nemožné určit geografická omezení

pro oblasti jejího pěstování [1].

Gruzie má tři historické vinařské regiony, které existovaly již v antických dobách. Největší a nejvýznamnější z nich je Kachetie, která je nejvýchodnější oblastí Gruzie. Rozkládá se pod jižními svahy Velkého Kavkazu a vyznačuje se suchým a teplým podnebím. Pochází odsud až 70 % hroznů vypěstovaných v Gruzii. Nachází se zde i vinařství Teliani Valley ve městě Cinandali, ze kterého pochází většina námi zkoumaných vzorků. Kolem hlavního města Tbilisi se rozprostírá oblast Kartli a na západě se rozkládá oblast Imereti charakterizovaná vlhčím a mírnějším klimatem. V současné době je vinařských regionů v Gruzii celkem pět: kromě výše jmenovaných ještě Rač'a-Lečchumi na jižních svazích západního Kavkazu a Gurie-Adžarsko-Samegrelo-Abcházie při pobřeží Černého moře, které se však svým charakterem řadí spíše mezi podoblasti oblasti imeretské. Vinohrady v Gruzii jsou chráněny hřebenem Velkého Kavkazu před studenými větry ze severu, a proto je zdejší klima obecně pro pěstování vinné révy velmi příznivé [1,8,9].

V rámci České republiky je nejvýznamnější vinařskou oblastí Morava, která se dále dělí do čtyř podoblastí a to Znojemské, Mikulovské, Velkopavlovické a Slovácké. Tato oblast zahrnuje 96 % vinic v České republice a vyznačuje se přechodným klimatem s příklonem k vnitrozemskému. Vegetační období je zde kratší nežli v západní Evropě, ale zrání vína je pomalejší [1,7].

2.1.5 Odrůdy

Dnes existuje asi 4000 odrůd vinné révy. Na lahvích bývají uváděna nejčastěji konkrétní jména odrůd a to i v případech, že název vína je místní, např. Chablis pro Chardonay, nebo se jedná o kupáž namíchanou z více odrůd [1].

V Gruzii lze nalézt až 500 odrůd a přibližně 40 z nich se používá pro komerční produkci vín. Typické původní odrůdy pěstované v Gruzii jsou Saperavi, Mudžuretuli, Alexandreuli, Odjaleshi, Rkaciteli, Tsolikauri, Aladasturi či Mcvane, ale díky tomu, že se dnešní vinaři jezdí školit do západní Evropy, pěstují se zde i celosvětově rozšířené odrůdy jako je Chardonay, Pinot Noir či Cabernet Sauvignon. Saperavi je asi nejzajímavější odrůdou červeného vína; má velmi masitou dužinu, která je bohatá na hroznový cukr a kyseliny. Víno je pak tmavě rubínové a má vysoký podíl alkoholu a taninů. Rkaciteli je zase velice přizpůsobivá odrůda dávající svěží bílá vína. Tato odrůda

se používá i pro výrobu kvalitního brandy [1,8,9].

Na Moravě se při výrobě vína dosahuje nejlepších výsledků s odrůdami Savignon blanc, Veltlínské zelené, Ryzlink vlašský a rýnský nebo Muškát moravský mezi bílými víny, u červených vín jsou to pak Svatovavřínecké, Zweigeltrebe a Frankovka [1]. Odrůda Svatovavřínecké se celosvětově nejvíce pěstuje v České republice. Je příbuzná s burgundskými odrůdami, avšak na rozdíl od nich je více přizpůsobivá. Patří mezi ranější odrůdy a je tedy vhodná i pro přípravu Svatomartinského vína. Oproti tomu Frankovka je odrůda pozdní a pěstuje se proto pouze na Moravě, protože vyžaduje výborné polohy a málo vody. Celkově je to odrůda rozšířená hlavně ve střední Evropě a pochází zřejmě z Rakouska. Zweigeltrebe, které vzniklo zkřížením těchto dvou odrůd, se více podobá Frankovce. Chuť tohoto vína je velice závislá na množství sklizených hroznů na jeden keř. Mezi odrůdy, které jsme použili pro naše analýzy, patří Cabernet Moravia, vyšlechtěný v Moravské Nové Vsi křížením Zweigeltrebe a Cabernetu Franc, který vyžaduje ty nejteplejší oblasti a zraje velmi pozdě, dále Cabernet Sauvignon, který je sedmou nejrozšířenější světovou odrůdou s velice charakteristickou chutí, a Rulandské modré (Pinot noir), patřící mezi burgundské odrůdy. Tuto celosvětově velmi rozšířenou odrůdu přivezl do Čech už ve středověku císař Karel IV. Dobře vyškolená vína této odrůdy mají jemné třísloviny a malý obsah kyselin [1,7].

2.1.6 Vliv na zdraví

Víno je po mnoho let považováno za zdraví prospěšné a řada vědců se to v dnešní době snaží dokázat a především určit příčinu těchto vlastností. Velké množství studií je věnováno vlivu pravidelné konzumace malých dávek vína na metabolismus lipidů. Většinou se jednalo o denní dávky nepřevyšující 50 g ethanolu za den tedy od 200 do 400 ml vína denně. Z výsledků pak vyplývalo, že tato denní dávka příznivě ovlivňuje hladinu cholesterolu. Dochází ke zvýšení HDL cholesterolu a snížení LDL cholesterolu, což vede ke snížení rizika úmrtí na srdeční infarkt. Dále bylo zjištěno, že se snižuje i hladina fibrinogenu, který ovlivňuje riziko vzniku aterosklerózy [2,10,11].

U červeného vína se předpokládá, že bude pro zdraví prospěšnější, protože díky způsobu jeho výroby se dostane do výsledného produktu mnohem více fenolyckých látek, které jsou nejvíce obsaženy ve slupkách bobulí. Například flavonoidy mají především antioxidační účinky. Stilbeny jsou zase považovány za hlavní příčinu snížení koronárních onemocnění srdce u pravidelných konzumentů vína. Zejména látka

resveratrol je uváděna jako faktor způsobující tzv. francouzský paradox. Jedná se o fakt, že lidé žijící v jižní Francii konzumují hodně mastných a kořeněných jídel a přesto mají nejnížší úmrtnost na srdeční selhání. Tento jev je vysvětlován jejich střídou a hlavně pravidelnou konzumací lokálních červených vín [2,3].

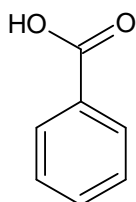
V Čechách proběhla krátkodobá studie prof. MUDr. Milana Šamánka, DrSc. a jeho spolupracovnice doc. MUDr. Zuzany Urbanové, CSc. mapující rozdíl vlivu červeného a bílého moravského vína na faktory ovlivňující aterosklerózu [2]. Studie probíhala měsíc u skupiny vybraných osob a výsledkem bylo potvrzení domněnek, že pití malého množství alkoholu je prospěšné a že bílé moravské víno je prospěšnější, protože snižuje hladinu fibrinogenu a zvyšuje hladinu volného i celkového HDL. Je tedy otázkou, zda antioxidanty obsažené hojněji ve víně červeném jsou nějak zodpovědné za snížení výskytu aterosklerózy při konzumaci vína. Doporučená dávka alkoholu na den byla stanovena na 20 – 40 g pro muže a 20 – 30 g pro ženy, protože ženy mají nižší aktivitu alkoholdehydrogenasy.

Je však nutné brát v úvahu to, že i přes možné prospěšné vlastnosti alkoholu, se stále jedná o látku, která je návyková a potenciálně zdraví nebezpečná. Ethanol je buněčný jed a u citlivějších osob hrozí při denních příjmech vyšších než 60 g jaterní cirhóza, zánět slinivky břišní či poruchy srdečního rytmu. Tedy se zvyšující se denní konzumací vína budou převažovat jeho negativní účinky nad prospěšnými [2].

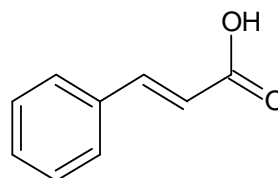
2.2 Biologicky významné látky ve víně

2.2.1 Fenolické kyseliny

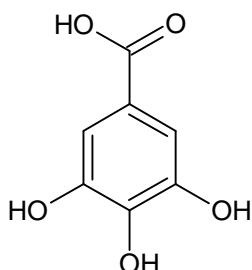
Tyto kyseliny se řadí do skupiny fenolů, které patří především mezi sekundární metabolity rostlin. Nachází se v mnoha potravinách jako volné kyseliny nebo ve formě esterů. Ve víně dochází při procesech fermentace a při skladování k částečné hydrolyze esterů. Především estery těchto kyselin jsou jednou z hlavních složek zodpovědných za chuťové a aromatické vlastnosti vína. Dělí se dle struktury na deriváty kyseliny hydroxyskořicové nebo na deriváty kyseliny hydroxybenzoové. Mají srovnatelné antioxidační účinky jako jejich polymerní protějšky, takže mohou přispívat k prospěšnému vlivu vína na nižší výskyt některých druhů rakoviny. Deriváty kyseliny skořicové mají vyšší antiradikálovou aktivitu, protože mají na benzenovém kruhu navázaný uhlíkový zbytek s konjugovanou dvojnou vazbou. Antioxidační účinek se dále zvyšuje s rostoucím počtem hydroxylových a methoxylových skupin [6,12,13].



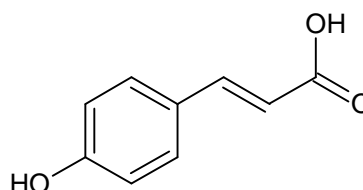
Obrázek 2.2 Benzoová kyselina



Obrázek 2.3 trans-skořicová kyselina



Obrázek 2.4 Gallová kyselina

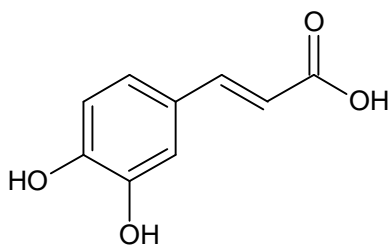


Obrázek 2.5 p-kumarová kyselina

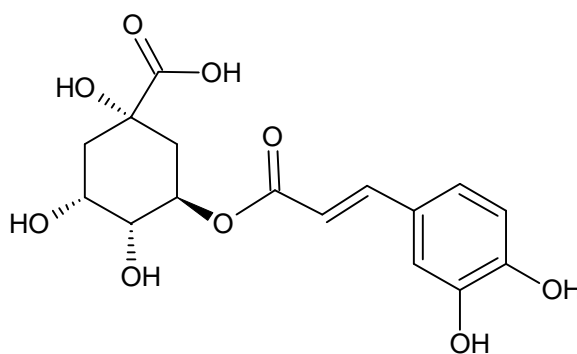
Nejčastějším derivátem benzoové kyseliny (Obr. 2.2) je gallová kyselina (Obr. 2.4) neboli 3,4,5-hydroxybenzoová. Ta se do vína nejčastěji dostává ze semen bobulí a z třapin, popřípadě se může louhovat z dubových sudů (hlavně nových) během fermentace. Častý je i její dimer egallová kyselina. Má antioxidační, adstringentní a antimikrobiální účinky, proto bylo víno dříve používáno na desinfekci ran [6,14].

U derivátů kyseliny skořicové (Obr. 2.3) se nejvíce setkáváme s kyselinou kumarovou (Obr. 2.5) a kávovou (Obr. 2.6). Nejčastějším esterem kyseliny kávové je kyselina chlorogenová (Obr. 2.7). Kávová kyselina je také meziproduktem při syntéze kyseliny ferulové a slouží jako stavební složka ligninu, který najdeme v buněčných stěnách dřevin. Kumarová kyselina existuje ve třech izomerních formách a díky své antioxidační aktivitě snižuje riziko rakoviny [6,12].

Celkový obsah kyselin závisí na odrůdě a na způsobu zpracování vinné révy.



Obrázek 2.6 Kávová kyselina

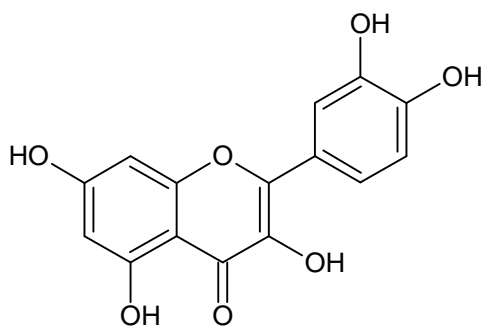


Obrázek 2.7 Chlorogenová kyselina

2.2.2 Flavonoidy

Tato skupina látek patří mezi polyfenoly spolu se skupinou taninů, které mají 3 a více fenolových jednotek. Flavonoidy jsou známy pro své antioxidační účinky, takže mohou snižovat riziko některých forem rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a výskytu mrtvice. Nachází se ve všech tkáních vyšších rostlin a to hlavně ve vakuolách. Zastoupení flavonoidů v rostlině je druhově specifické. U živočichů se vyskytují pouze výjimečně například u motýlů, kdy se jedná spíše o akumulaci látek po požití rostliny. Mezi hlavní skupiny flavonoidů patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, anthokyanidiny a izoflavonoidy. V přírodě se vyskytují nejčastěji vázané jako estery, ale při vyšších teplotách či v kyselém prostředí dochází k jejich částečné hydrolyze, proto je ve víně vyšší podíl volných flavonoidů [6,10,12].

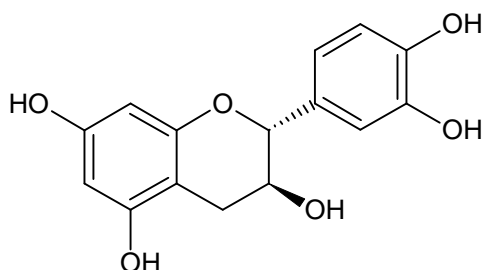
Mezi nejčastější flavonoly patří kvercetin (Obr. 2.8), který se nachází ve slupkách bobulí a slouží jako ochrana před poškozením ultrafialovým zářením. Čím více je rostlina vystavena slunečnímu světlu, tím více kvercetinu vytváří. Kvercetin je schopen reagovat s anthokyaniny za vzniku stabilnějších sloučenin s intenzivnějším zabarvením. Kvercetin samotný je zbarvený žlutě. Dalším velmi běžným rostlinným flavonolem je rutin. Ten je využíván ve farmaceutickém průmyslu, protože snižuje, především v kombinaci s kyselinou askorbovou, fragilitu a permeabilitu kapilár. Mezi další flavonoly hojně obsažené ve víně patří kaempferol a myricetin [10,12,14].



Obrázek 2.8 Kvercetin

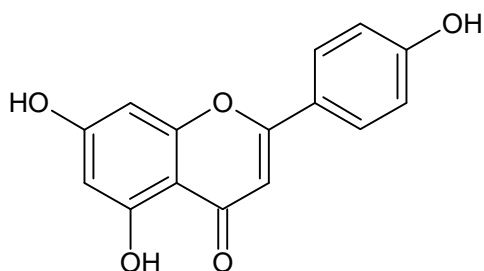
Flavanoly jsou zastoupeny zejména katechiny, tedy katechinem (Obr. 2.9), epikatechinem a epigallokatechinem. Především ony jsou zodpovědné za kyselou až svíravou chuť vína, protože tvoří komplexy s taniny, či jsou sami stavebními složkami tříslovin. Čím menší je molekulová hmotnost vzniklé sloučeniny, tím je chuť intenzivnější, jelikož lépe reaguje s chuťovými buňkami. Katechiny jsou pro vinaře

velmi důležité, protože dle jejich obsahu ve víně lze určit rozsah extrakce ze semen bobulí. Jejich obsah ve zralejších hroznech klesá [10,14,15].

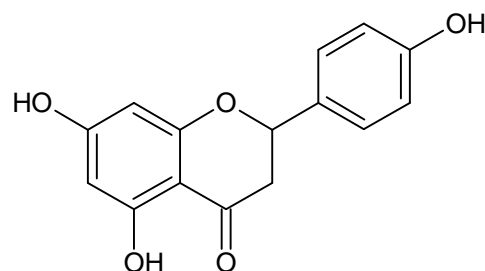


Obrázek 2.9 (+)-katechin

Apigenin (Obr. 2.10) a luteolin patří mezi flavony. Jsou to žlutá barviva běžně zastoupená ve vyšších rostlinách. Flavanony, které jsou silnými antioxidanty, se hojně vyskytují v citrusových plodech. Jejich typickým zástupcem je například naringenin (Obr. 2.11) [10,12].



Obrázek 2.10 Apigenin



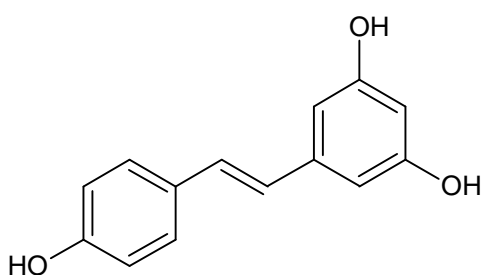
Obrázek 2.11 Naringenin

Anthokyanidiny jsou aglykony tvořící základ červených, modrých a fialových barev květů a plodů. V přírodě se vyskytují především ve formě glykosidů a významně určují výslednou barvu hroznů. Ta kromě jejich koncentrace závisí i na pH daného prostředí (vakuolárních šťáv), které výrazně ovlivňuje zbarvení anthokyanů. Důležitý je především počet volných hydroxylových skupin, které způsobí modré zbarvení, a počet methylových skupin zodpovědných za červenou barvu. Protože víno má pH poměrně nízké, většina těchto sloučenin je přítomna ve své červené formě. S vyzrálostí hroznů stoupá i podíl glykosidů, avšak u přezrálých hroznů jejich obsah opět klesá. Někdy je barva ovlivněna i přítomností kovů, které mohou s anthokyanidiny tvořit různé komplexy. Jako monoglykosidy se vyskytují delphinidin, petunidin, malvidin a peonidin. Aby se tyto látky dostaly i do výsledného produktu je nutné buňky slupek bobulí, kde je jich nejvíce, důkladně rozrušit [6,10,14].

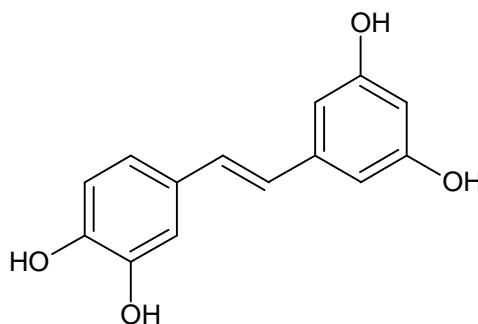
2.2.3 Stilbeny

Tyto látky jsou biogeneticky příbuzné s flavonoidy, ale mají jednodušší strukturu odvozenou od 1,2-difenylethylenu. Patří mezi nejvíce zkoumané látky, co se týče pozitivních vlastností vína na srdeční a koronární onemocnění. Jsou obsaženy především ve slupkách bobulí [4].

Nejdůležitějším zástupcem je resveratrol (Obr. 2.12), který tvoří dva izomery. Obsah této látky v bobulích narůstá, jsou-li infikovány plísní nebo je rostlina ve stresu. Je to totiž jedna ze složek protiplísňové bariéry vinné révy. Některé plísně jsou však schopné tuto bariéru překonat a poté resveratrol transformovat na oligomery, které mají také prospěšné účinky. Ušlechtilé plísně (např. *Botrytis cinerea*) jsou takto využívány při výrobě některých druhů vín. Bobule napadené tímto druhem plísně se nazývají ciběby. Ty jsou základem tokajských vín, která jsou pak na resveratrol nejbohatší. Tento druh odpovědi na stres vede k tomu, že některá bílá vína, která jsou vyráběna kvašením vinného moštu bez přítomnosti slupek, kde je resveratrolu nejvíce, mohou tuto látku obsahovat v poměrně vysokých koncentracích, pokud byla vyrobena z hroznů napadených plísněmi. Naproti tomu v červených vínech, vyráběných kvašením bobulí i se slupkami, mohou být koncentrace resveratrolu velmi nízké, pokud hrozny dozrávaly v ideálních podmínkách a nebyly plísněmi napadeny. Je tedy obtížné předem odhadnout, která odrůda bude na tuto látku nejbohatší, protože výslednou koncentraci ovlivňuje velké množství faktorů. Mezi analogy resveratrolu patří piceatannol (Obr. 2.13) či pterostilben [4,14,16].



Obrázek 2.12 trans-resveratrol



Obrázek 2.13 trans-piceatannol

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Vína:

Tabulka 3.1 Seznam použitých vzorků vín

Kód vzorku	Odrůda	Producenti (oblast)	Rok
CZ1	Rulandské modré	VUNIUM Velké Pavlovice (Velkopavlovická)	2008
CZ2	Cabernet Sauvignon	Vino Mikulov (Mikulovská)	-
CZ3	Cabernet Sauvignon	Templářské sklepy Čejkovice (Velkopavlovická)	2008
CZ4	Cabernet Moravia	Templářské sklepy Čejkovice (Velkopavlovická)	-
CZ5	Cabernet Moravia	Vinselekt Michlovský (Velkopavlovická)	2007
GE6	Saperavi	IE Givi Nikolashvili BioProduct (Kachetie)	2008
GE7	Saperavi (aged in oak, unfiltered)	Teliani Valley PLC (Kachetie - Tsinandali)	2007
GE8	Saperavi	Teliani Valley PLC (Kachetie - Napareuli)	2005
GE9	Saperavi	Teliani Valley PLC (Kachetie - Mukuzani)	2006
GE10	Saperavi	Teliani Valley PLC (Kachetie - Akhasheni)	2004
GE11	Cabernet Sauvignon	Teliani valley PLC (Kachetie – Teliani valley)	2005

3.1.2 Standardy:

od firmy Sigma-Aldrich, USA: kyselina salicylová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina anisová, kyselina p-kumarová, kyselina m-hydroxybenzoová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina trans-skořicová, kyselina vanilová, kyselina ferulová, kyselina gallová, kyselina fluorsalicylová, kyselina syringová, trans-resveratrol, kvercetin, (-)-epikatechin, (-)-katechin, piceatannol, myricetin, naringenin, kaempferol, apigenin

od firmy Carl Roth GmbH&Co, Německo: Rutin, luteolin, luteolin-7-glukosid

od firmy Fluka, USA: sinapová kyselina

3.1.3 Ostatní chemikálie:

hydroxid sodný p. a. (Lach-Ner, ČR), methanol pro HPLC $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, USA), acetonitril pro LC/MS 99,9% (Fisher Scientific, USA),

2,6-di-tert-butyl-4-metylfenol min. 99,9% (Sigma-Aldrich, USA), kyselina chlorovodíková 35% p. a. (Penta, ČR), kyselina octová 99,8% ledová p. a. (Penta, ČR),

diethylether p. a. (Penta, ČR), ethylalkohol pro UV spektroskopii – 96% (Penta, ČR)

3.2 Zařízení

deionizovaná voda pro HPLC, Sci-Aqua, SISW, ČR

vakuová odparka Büchi, Rotavapor R-114, Švýcarsko

analytické váhy Boeco, Německo

pH metr Thermo Scientific, USA

pH elektroda Hamilton, Švýcarsko

centrifuga Hettich, Micro 20, Německo

centrifuga Hettich, Universal 32 R, Německo

Refrigerated CentriVap Concentrator, Labconco, USA

přístroj HPLC:

pumpa: Q-Grad, Watrex, ČR

kolona s předklonkou a předfiltrem: Phenomenex, Kinetex 2,6u PFP, 100A
(150 x 4,6 mm), USA

detektory: SpectraSystem, UV 6000 LP, Thermo Finnigan, USA

FP-920, Jasco, USA

autosampler: Midas, Spark, Nizozemí

termostat: Mistral, Spark, Nizozemí

3.3 Příprava standardů

Připravila jsem si roztoky standardů v různých koncentracích dle potřeby, jak je uvedeno v Tab. 3.2.

Tabulka 3.2 Roztoky standardů

standard	koncentrace mg·ml ⁻¹	standard	koncentrace mg·ml ⁻¹
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	4	katechin	1
gallová kyselina	4	syringová kyselina	1
m-hydroxybenzoová kyselina	4	rutin	1
epikatechin	4	luteolin-7-glukosid	1
p-hydroxybenzoová kyselina	4	sinapová kyselina	1
fluorsalicylová kyselina	4	kumarová kyselina	1
resveratrol	2	anisová kyselina	1
vanilová kyselina	2	myricetin	1
káвовá kyselina	2	skořicová kyselina	1
salicylová kyselina	2	kvercetin	1
ferulová kyselina	2	luteolin	1
chlorogenová kyselina	2	naringenin	1
piceatannol	2	kaempferol	1
-	-	apigenin	1

Standardy jsem rozpouštěla v čistém methanolu. Výjimku tvořil kvercetin, který jsem rozpustila v ethanolu, a luteolin-7-glukosid. 1 mg této látky jsem rozpustila v 900 μl methanolu a 100 μl 0,1 mol·dm⁻³ hydroxidu sodného.

Následně jsem si připravila směsný roztok tak, že jsem do jedné zkumavky nepipetovala po 25 μl standardů o koncentraci 4 mg·ml⁻¹, po 50 μl standardů o koncentraci 2 mg·ml⁻¹ a po 100 μl standardů o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Tento roztok jsem doplnila metanolem na objem 2 ml a výsledná koncentrace zásobního roztoku standardů byla 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do vialek jsme pomocí ředění methanolem z tohoto roztoku připravila kalibrační roztoky o koncentracích 50; 25; 10; 5; 2,5; 1 a 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.4 Extrakce látek z vína

Před extrakcí jsem si připravila roztok 2,6-di-tert-butyl-4-metylfenolu o koncentraci 0,2 mg·ml⁻¹ rozpuštěním v methanolu a roztok vnitřního standardu, kterým byla fluorsalicylová kyselina. Tu jsem rozpustila v methanolu a zředila na koncentraci 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

K 4,75 ml vzorku vína v extrakční zkumavce jsem přidala 100 μl roztoku fluorsalicylové kyseliny a 150 μl roztoku 2,6-di-tert-butyl-4-metylfenolu, který slouží jako antioxidant. Pomocí kyseliny chlorovodíkové jsem upravila pH vzorku na 2. Zkumavku jsem vložila do vymrazovacího koncentrátoru na 2 hodiny, aby se odpařil alkohol. Takto upravený vzorek jsem třikrát extrahovala pomocí 5 ml diethyletheru. Po každé extrakci jsme vzorek nechala 5 minut stočit na 4000 otáček a následně odpipetovala organickou fází do baňky. Tu jsem vysušila na rotační vakuové odparce. Baňku s extraktem jsme poté vymyla dvakrát 1 ml diethyletheru a převedla extrakt do vialky. Opět jsem provedla vysušení tentokrát pomocí proudu dusíku. Extrakt ve vialce jsem rozpustila v 0,5 ml roztoku acetonitrilu a vody v poměru 1:1. Roztok jsme stočila v mikrocentrifuze na 3 minuty při maximálních otáčkách a odpipetovala 100 μl do insertu.

3.5 HPLC analýza

Mobilní fáze A byl 0,5% vodný roztok kyseliny octové a mobilní fáze B byl 0,5% acetonitrilový roztok kyseliny octové. Kolona byla zahřívána v termostatu na teplotu 33 °C a vzorky byly pomocí autosampleru nastříkovány na kolonu v objemech

5 či 10 μ l dle potřeby. Analýza probíhala gradientovou elucí a trvala 61 minut. Složení mobilní fáze během analýzy uvádí Tab. 3.3.

Tabulka 3.3 Gradient mobilní fáze: fáze A = 0,5% CH_3COOH ve vodě
fáze B = 0,5% CH_3COOH v acetonitrilu

čas (min)	0	10	14	25	34	38	48	51	61
koncentrace fáze A (%)	96	85	79	78	59	0	0	96	96
koncentrace fáze B (%)	4	15	21	22	41	100	100	4	4

Průtok mobilní fáze činil 1 ml/min. UV absorpční spektra byla snímána pomocí diodového pole v oblasti mezi 194 a 500 nm. Vzorky pak byly kvantifikovány při vlnových délkách 260 a 300 nm. Jako doplňující informace pro kontrolu identity u sporných případů byla použita fluorescenční detekce, kde vlnová délka excitace byla nastavena na 278 nm a emise na 360 nm. Pro vyhodnocení dat byly použity softwary Clarity, DataApex, ČR a EZ-Chrom Elite, ThermoFinnigan, USA.

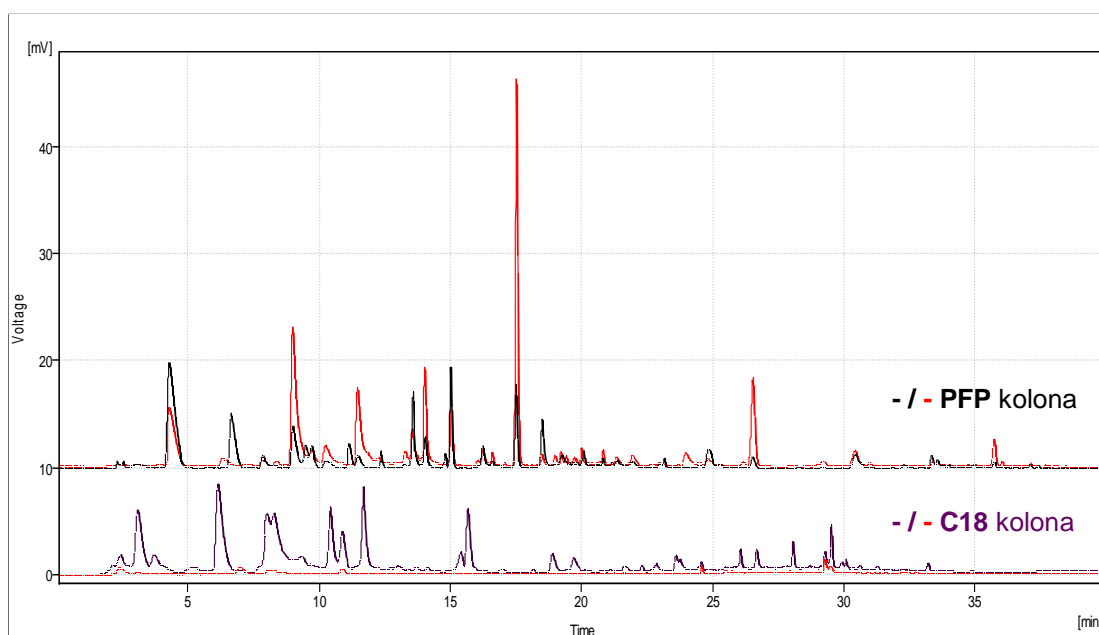
4. Výsledky a diskuse

4.1 Příprava vzorku

Rozhodla jsem se pro několikanásobnou extrakci vína diethyletherem po předchozí úpravě pH, popsanou v [17], protože teoreticky jsem schopná touto metodou extrahovat z vína více různorodých látek a i ve studii [18] se tato extrakce ukázala jako výhodnější. Pro případnou analýzu většího množství vzorků by však bylo možné vyzkoušet i extrakci na pevné fázi (SPE) pomocí komerčních kolonek [15,18].

4.2 Optimalizace HPLC analýzy

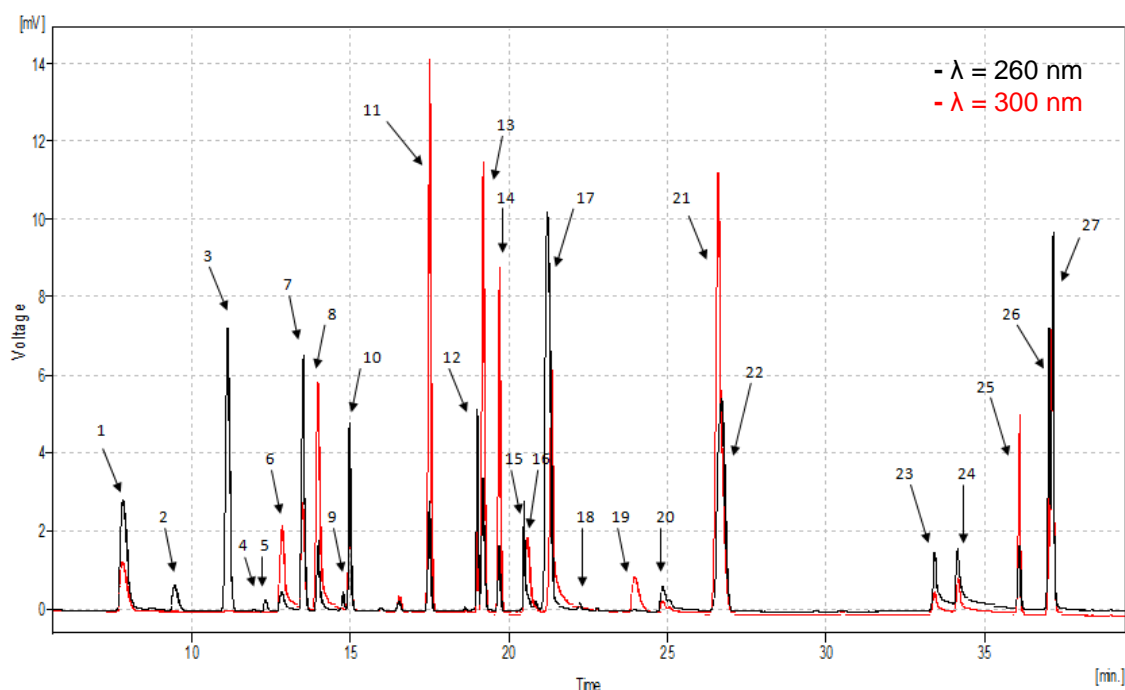
Při optimalizaci metody jsem vycházela ze článků zaměřených na podobnou analýzu. Nejprve jsem zkusila provést analýzu na koloně od firmy Phenomenex, USA typu Kinetex XB – C18, 100A (150 x 4,6 mm), protože tento typ kolony byl používán nejčastěji [13,15,18]. Při pokusných měřeních s použitím mobilní fáze založené na gradientu voda (polární fáze, A) a acetonitril (organická fáze, B) a modifikované přísadkou 0,1 %, 0,5 %, 1 % objemových kyseliny octové jsem nedosáhla optimální separace zvolených látek, jak ukazuje Obr. 4.1. Ke zlepšení separace nedošlo ani po změnách teplot kolony, které jsem testovala v rozsahu 25 - 35 °C po 2 °C. Po přechodu na typ kolony Kinetex 2,6u PFP, 100A (150 x 4,6 mm) jsem určila jako optimální teplotu kolony 33 °C, úpravu kyselosti mobilní fáze přísadkou 0,5 % v kyseliny octové a gradient dle Tab. 3.3. Za těchto podmínek docházelo k účinné separaci především fenolických kyselin a stilbenů. U flavonoidů docházelo při optimalizaci vlivem zvyšování kyselosti mobilní fáze k rozmývání píků. Stávající mobilní fáze a tím i obsah octové kyseliny jsou kompromisem mezi účinností separace fenolických kyselin a flavonoidů, proto nebylo u některých flavonoidů dosaženo ideálního tvaru píků. Pro zlepšení separace by bylo nutné rozdělit standardy alespoň na dvě skupiny a upravovat složení mobilní fáze pro každou zvlášť. Cílem však bylo separovat při jedné analýze co nejvíce látek.



Obrázek 4.1 Porovnání HPLC chromatogramů vzorku vína CZ5 na různých kolonách pro vlnové délky 260 nm (černá/fialová) a 300 nm (červené). Podmínky separace: teplota 33 °C, mobilní fáze A: voda, mobilní fáze B: acetonitril, obsah kyseliny octové 0,5 % vv v každé fázi, gradient viz Tab. 3.3

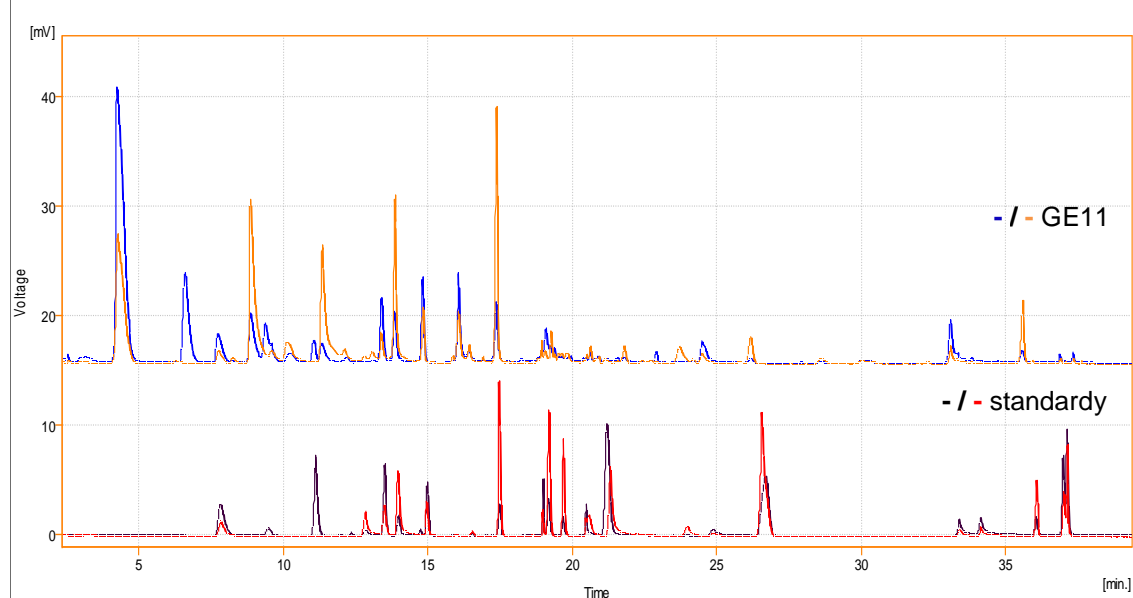
4.3 Obsah fenolických látek v červených vínech

Identifikace látek ve vzorcích probíhala pomocí srovnání s absorpčními spektry a retenčními časy standardů (Obr 4.3). Přehled absorpčních spekter standardů je uveden v přílohách. Pro sestavení kalibračních křivek byla použita data naměřená pomocí roztoku standardů o různých koncentracích (Obr. 4.2). Vybrané látky byly opakovaně kalibrovány, tedy kyselina chlorogenová, luteolin-7-glukosid, piceatannol, myricetin, resveratrol, kyselina fluorosalicylová, kvercetin, luteolin, kyselina salicylová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina kumarová a kyselina anisová. Kvantifikace jednotlivých látek byla provedena při různých vlnových délkách s ohledem na jejich absorpční maxima a případný vliv okolní (částečná koeluce, nejvíce patrná u kyseliny skořicové a resveratrolu). Při kalibraci flavonoidů nebyla odezva signálu na zvyšující se koncentraci lineární, proto byla pro sestavení kalibrační křivky použita polynomická regrese, která popisovala závislost odezvy na koncentraci velmi dobře – $R^2 \geq 0,999$ (Tab. 4.1). Nelinearita byla způsobena patrně rozmýváním píků při vyšších koncentracích.



Obrázek 4.2 HPLC chromatogram standardů o koncentraci $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podmínky separace: teplota 33°C , mobilní fáze A: voda, mobilní fáze B: acetonitril, obsah kyseliny octové 0,5 % vv v každé fázi, gradient viz Tab. 3.3

Číslování píků: 1 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, 2 gallová kyselina, 3 p-hydroxybenzoová kyselina, 4 m-hydroxybenzoová kyselina, 5 (-)-katechin, 6 chlorogenová kyselina, 7 vanilová kyselina, 8 kávová kyselina, 9 epikatechin, 10 syringová kyselina, 11 salicylová kyselina, 12 rutin, 13 ferulová kyselina, 14 sinapová kyselina, 15 kumarová kyselina, 16 luteolin-7-glukosid, 17 anisová kyselina, 18 piceatannol, 19 fluorsalicylová kyselina, 20 myricetin, 21 skořicová kyselina, 22 resveratrol, 23 kvercetin, 24 luteolin, 25 naringenin, 26 kaempferol, 27 apigenin.



Obrázek 4.3 Srovnání HPLC chromatogramů standardů a vzorku vína GE11 pro vlnové délky 260 nm (černá/modrá) a 300 nm (červená/oranžová). Podmínky separace: teplota 33°C , mobilní fáze A: voda, mobilní fáze B: acetonitril, obsah kyseliny octové 0,5 % vv v každé fázi, gradient viz Tab. 3.3

Tabulka 4.1 Regresní rovnice a R^2 jednotlivých standardů

standard	regresní rovnice	R^2
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	$y = 40,152x - 94,307$	0,9981
gallová kyselina	$y = 6,5836x - 12,097$	0,9990
m-hydroxybenzoová kyselina	$y = 62,677x - 100,01$	0,9992
katechin	$y = 0,0024x^2 + 1,5331x - 3,618$	0,9991
chlorogenová kyselina	$y = 0,0263x^2 + 17,849x - 22,01$	1,0000
p-hydroxybenzoová kyselina	$y = 62,501x$	0,9994
vanilová kyselina	$y = 43,407x - 63,389$	0,9992
kávová kyselina	$y = 55,455x - 206,26$	0,9968
epikatechin	$y = 2,4629x - 2,9355$	0,9993
syringová kyselina	$y = 25,884x - 40,575$	0,9991
salicylová kyselina	$y = 15,275x - 9,9396$	0,9998
rutin	$y = 18,202x - 40,333$	0,9985
ferulová kyselina	$y = 56,528x - 89,829$	0,9992
luteolin-7-glukosid	$y = 24,912x - 42,913$	0,9988
sinapová kyselina	$y = 38,338x - 63,667$	0,9992
kumarová kyselina	$y = 16,138x - 1,5724$	0,9999
anisová kyselina	$y = 54,251x + 121,38$	0,9969
piceatannol	$y = 48,694x - 79,046$	0,9994
fluorosalicylvá kyselina	$y = 13,981x - 20,406$	0,9996
myricetin	$y = 0,0232x^2 + 9,6822x - 48,008$	0,9996
skořicová kyselina	$y = 57,41x$	0,9993
resveratrol	$y = 74,313x + 42,819$	0,9993
kvercetin	$y = 0,0349x^2 + 27,792x - 59,012$	0,9998
luteolin	$y = 0,0196x^2 + 29,736x - 58,98$	0,9997
naringenin	$y = 25,571x - 40,802$	0,9992
kaempferol	$y = 34,225x - 70,618$	0,9988
apigenin	$y = 45,162x - 91,816$	0,9991

Výsledky získané pomocí regresních rovnic byly následně přepočítány pomocí koeficientů, které korelovaly chyby ve výsledcích vzniklé při zpracování vzorku. Koeficienty byly vypočítány na základě ztrát vnitřního standardu, tedy fluorsalicylvé kyseliny, v jednotlivých vzorcích. Její předpokládaný obsah ve vzorku byl $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Vypočítaný obsah v jednotlivých vzorcích pak shrnuje Tab. 4.2.

Tabulka 4.2 Obsah kyseliny fluorsalicylvé ve vzorku vína

vzorek	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4	CZ5	GE6	GE7	GE8	GE9	GE10	GE11
fluorsalicylvá kyselina $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	23,38	28,27	28,95	28,40	24,23	28,95	22,97	30,09	23,46	26,83	32,69

Tabulka 4.3 Obsah fenolických kyselin ve vzorcích vína v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

vzorek	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	gallová kyselina	m-hydroxybenzoová kyselina	chlorogenová kyselina	p-hydroxybenzoová kyselina
CZ1	12,06	14,71	3,08	ND	ND
CZ2	4,88	18,23	2,97	ND	ND
CZ3	6,91	12,89	1,76	ND	ND
CZ4	0,80	16,98	2,38	ND	ND
CZ5	3,15	16,71	2,68	ND	0,05
GE6	9,68	17,62	2,33	ND	ND
GE7	5,46	18,83	2,25	4,14	ND
GE8	3,99	9,25	ND ^a	2,16	ND
GE9	2,57	14,12	2,17	ND	ND
GE10	5,86	11,40	1,96	ND	0,16
GE11	4,61	22,96	1,69	ND	0,06

vzorek	vanilová kyselina	kávoá kyselina	syringová kyselina	salicylová kyselina	ferulová kyselina	sinapová kyselina	kumarová kyselina	skořicová kyselina
CZ1	12,87	18,19	12,75	15,92	2,46	0,82	ND	ND
CZ2	7,99	28,98	9,36	19,60	1,57	0,78	0,45	0,02
CZ3	5,04	6,11	5,41	9,54	1,01	0,60	ND	ND
CZ4	8,23	9,75	9,92	15,62	1,73	0,63	0,32	0,01
CZ5	7,95	8,58	14,46	19,34	0,67	1,22	2,33	ND
GE6	13,15	15,50	11,01	19,70	0,79	ND	ND	ND
GE7	8,88	11,63	13,01	29,07	ND	ND	ND	ND
GE8	5,37	4,47	10,42	11,29	0,96	0,69	1,18	ND
GE9	7,76	22,93	11,28	27,23	1,53	ND	ND	ND
GE10	5,94	9,20	8,55	18,24	0,90	ND	ND	ND
GE11	5,08	10,09	8,72	9,25	1,36	ND	ND	ND

^a ND = nedetekováno

Dle Tab. 4.3 byla nejbohatší na fenolické kyseliny vína Cabernet Sauvignon z Mikulova (CZ2) a nefiltrované Saperavi (GE7). Oproti tomu Cabernet Sauvignon z Velkopavlovické oblasti (CZ3) obsahoval kyselin nejméně. Nejvyšší koncentrace kyseliny gallové byla zjištěna u vzorku Cabernetu Sauvignon, pocházejícího z Teliani valley (GE11). Toto víno zraje v dubových sudech přivezených z Francie [19], což bude pravděpodobně hlavní důvod jejího vyššího obsahu. Ostatní odrůdy z Čech i Gruzie obsahují srovnatelné množství této kyseliny. Pro srovnání, ve vínech pěstovaných v Thajsku byly nalezeny podobné koncentrace této kyseliny a nejvyšší koncentrace okolo $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byly v odrůdě Barbera [20]. Při analýze vín z Kanárských ostrovů byly v červených vínech zjištěny vyšší koncentrace než v našich vzorcích, ale v bílém víně dosahovaly pouze $0,54 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [17]. Z hydroxybenzoových kyselin se ve vzorcích nacházelo nejvíce kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové, kyselina m-hydroxybenzoová se vyskytovala v koncentracích menších a p-hydroxybenzoová kyselina byla nalezena

pouze ve třech vzorcích ve stopovém množství. Nejbohatší na tyto kyseliny pak byla odrůda Rulandského modrého (CZ1). Vanilové kyseliny obsahovala vína většinou přibližně srovnatelné koncentrace. Nejvíce této kyseliny bylo ve víně Saperavi z biovinářství Givi Nikolashvili (GE6) a v Rulandském modrém (CZ1) a to až dvojnásobné množství než v ostatních vínech. Kyselina kávová se ve vysoké koncentraci nachází v Cabernetu Sauvignon z Mikulova (CZ2), dokonce pětkrát převyšuje obsah, který je ve stejné odrůdě z Čejkovic (CZ3). Nejméně syringové kyseliny obsahuje Saperavi z oblasti Napareuli (GE8). Toto víno však obsahuje ester kyseliny kávové a to kyselinu chlorogenovou. Ta byla detekována pouze ve dvou vzorcích, kromě uvedeného ještě v nefiltrovaném Saperavi (GE7). Ve všech vzorcích se nacházela i kyselina syringová. Koncentrační rozdíly byly celkově méně významné. Její nejnižší koncentraci jsem naměřila v Cabernetu Sauvignon z Čejkovic (CZ3), zatímco nejvyšší hodnoty a to až trojnásobné obsahoval Cabernetu Moravia z vinařství Michlovský (CZ5). Salicylová kyselina se nachází ve všech vzorcích v relativně vysokých koncentracích. Co se týče odrůd, nejbohatší je obecně Saperavi, u Cabernetu Sauvignon je víno z Mikulova (CZ2) dvakrát bohatší než ostatní vína této odrůdy. Zajímavé je porovnání s thajskými víny, ve kterých se kyselina salicylová vyskytovala v nízkých koncentracích maximálně okolo $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [20]. Kyselina ferulová byla ve všech vzorcích v poměrně nízkých koncentracích. Česká vína jí obsahovala nepatrně větší množství než gruzínská. Kyseliny kumarová a sinapová se nacházely v malém množství spíše v českých vínech a to nejvíce v Cabernetu Moravia z vinařství Michlovský (CZ5). Kumarová kyselina byla nelezena ve vyšších koncentracích až $26 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v odrůdě Shiraz pěstované v Thajsku [20]. Kyselina anisová nebyla detekována v žádném vzorku. Kyselina skořicová se vyskytovala v zanedbatelném množství pouze ve dvou vzorcích českých vín. Její nízké koncentrace ve všech odrůdách dokazuje i analýza thajských vín, u kterých nebyla asi v polovině vzorků detekována [20].

Tabulka 4.4 Obsah flavonoidů a stilbenů ve vzorcích vína v $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

vzorek	katechin	epikatechin	piceatannol	myricetin	resveratrol
CZ1	ND ^a	ND	2,10	3,54	13,33
CZ2	56,49	35,93	1,58	3,60	10,44
CZ3	13,36	5,12	0,94	1,40	2,88
CZ4	32,07	12,98	1,29	4,66	5,02
CZ5	35,58	18,57	1,52	4,88	6,89
GE6	6,82	1,13	1,16	1,39	3,86
GE7	34,62	12,02	1,33	18,19	8,06
GE8	14,53	22,17	0,84	5,30	1,33
GE9	33,73	14,62	0,77	ND	4,82
GE10	ND	ND	1,44	5,27	0,79
GE11	13,64	1,22	0,56	4,09	1,33

vzorek	kvercetin	luteolin	naringenin	kaempferol	apigenin
CZ1	2,01	ND	0,91	0,75	ND
CZ2	0,92	ND	ND	ND	ND
CZ3	0,70	ND	ND	ND	ND
CZ4	2,74	ND	ND	ND	ND
CZ5	2,61	ND	ND	0,93	ND
GE6	12,50	ND	1,10	0,99	ND
GE7	15,01	ND	ND	2,32	0,89
GE8	7,25	0,67	ND	1,04	0,68
GE9	10,80	ND	1,03	1,71	0,89
GE10	4,35	ND	14,22	0,75	0,77
GE11	5,73	0,69	8,76	0,98	0,56

^a ND = nedetekováno

Tab. 4.4 ukazuje, že na resveratrol byla obecně bohatší česká vína a nejvíce ho bylo v Rulandském modrém (CZ1). V gruzínských vínech byl obsah nižší až na nefiltrované Saperavi (GE7), které bylo obsahově srovnatelné s českými. Cabernet Sauvignon z Mikulova (CZ2) obsahoval až čtyřikrát více resveratrolu než stejná odrůda z Čejkovic (CZ3). Podobně nízké koncentrace byly nalezeny u téže odrůdy pěstované v Brazílii [16] či v Maďarsku a to kolem $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [21]. Nízké až stopové koncentrace resveratrolu byly nalezeny v červených thajských vínech, v bílých vínech nebyl resveratrol detekován [20]. To může značit, že české vinice více trpí na choroby, či jsou rostliny během růstu více vystaveny stresu. Resveratrol je totiž typickým fytoalexinem [4]. Piceatannol, metabolit resveratrolu, je pak obsažen ve vínech v mnohem nižších koncentracích než resveratrol, ale i jeho je více v českých vínech a nejvíce v Rulandském modrém (CZ1).

Kvercetin je významněji zastoupen v gruzínských vínech a to v několikanásobném množství. V nefiltrovaném Saperavi (GE7) a Saperavi z biovinářství Givi Nikolashvili

(GE6) je koncentrace kvercetinu nejvyšší. Tento rozdíl je dán nejspíše klimatickými podmínkami, ve kterých se nachází vinice, protože ty gruzínské jsou více vystaveny slunci a kvercetin je jedna z látek, která chrání bobule před UV zářením [14]. Dalším důvodem bude asi postup zpracování. Dá se předpokládat, že je pro tato dvě vína odlišný a do konečného produktu se pak dostane více flavonoidů, které se obecně nacházejí nejvíce ve slupkách bobulí [6]. Vína pěstovaná v Chorvatsku mají maximálně poloviční obsah kvercetinu, než se průměrně nachází v gruzínských vínech [11], stejně je tomu u vín pěstovaných v Maďarsku [21].

Katechin a epikatechin se nachází v nejvyšších koncentracích v Cabernetu Sauvignon z Mikulova (CZ2). V Rulandském modrém (CZ1) a Saperavi z oblasti Akhasheni (GE10) však nebyla obsažena ani jedna z těchto látek. Můžeme tedy předpokládat, že se tato vína budou lišit chutí, protože budou obsahovat rozdílné množství taninů. Jednou cestou jejich vzniku je totiž kondenzace flavanolů [6]. Dále si můžeme všimnout, že obsahuje-li víno vyšší koncentraci jedné z těchto látek, je i druhá přítomna ve významné koncentraci. To bylo zjištěno také v analýzách chorvatských vín, kde čím je vyšší obsah katechinu (až $138 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), tím vyšší je koncentrace epikatechinu [11]. Stejný trend dokazuje i analýza brazilských vín, u nich je však maximální koncentrace katechinu $35 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [16]. V bílých thajských vínech nebyl epikatechin detekován a katechin se nacházel v zanedbatelných koncentracích [20]. Tento jev může být dán faktem, že katechin a epikatechin jsou si strukturně velmi blízké [10].

Rutin a luteolin-7-glukosid nebyly ve vzorcích detekovány vůbec a luteolin byl přítomen pouze ve dvou vínech v malém množství. Apigenin se nacházel pouze v gruzínských vínech a to v nízkých koncentracích. Naringenin byl ve většině vzorků obtížně detekovatelný, ale v Saperavi z oblasti Akhasheni (GE10) a v Cabernetu Sauvignon z Kachetie (GE11) byl jeho obsah poměrně vysoký. Koncentrace myricetinu se téměř ve všech vzorcích vyskytovaly velmi nízké, pouze v nefiltrovaném Saperavi (GE7) byla jeho koncentrace mnohonásobně vyšší. Kaempferol se ve víně nacházel v nízkých koncentracích, obecně ho bylo více v gruzínských vínech.

4.4 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno metodami vícerozměrných statistických analýz - metodou hlavních komponent (PCA) a shlukovou analýzou. Výpočet a vlastní

analýza byla provedena pomocí programu STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., OK, USA). Při zadávání dat jsme předem eliminovali chyby tím, že jsme do statistiky nezahrnuli látky ve vzorcích se nevyskytující či látky přítomné pouze ve třech a méně vzorcích.

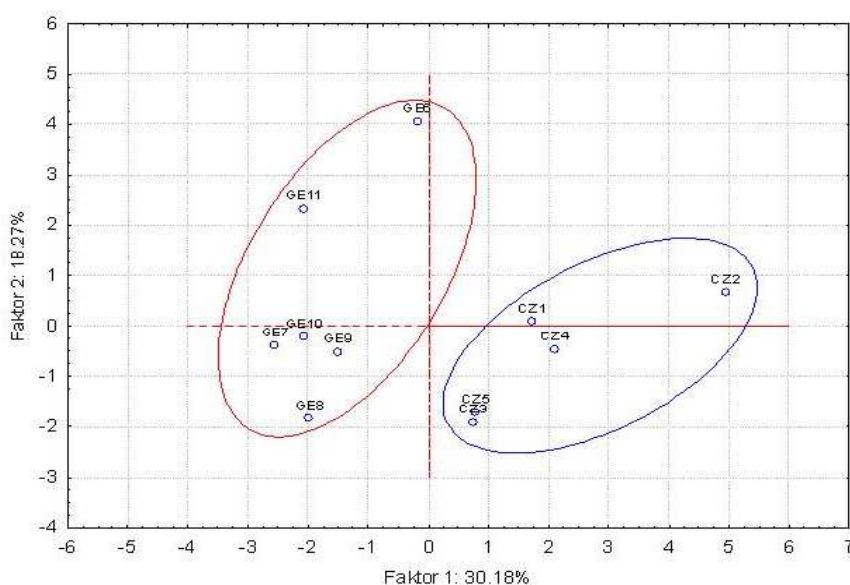
Z výsledků analýzy hlavních komponent (PCA) je patrné, že na základě obsahu měřených látek je možné rozlišit vína do dvou skupin (Obr. 4.4). Jednu tvoří vína z Gruzie a druhou vína z ČR. Score plot (Obr. 4.5) ukazuje, rozdíly v koncentracích látek, které se na separaci obou skupin podílejí nejvýznamněji. Nejvýznamnější látky jsou pak ty, které se blíží ose faktoru 1 a mají největší vzdálenost od středu, tedy bodu {0.0, 0.0}. Látky zastoupené ve větších koncentracích ve vínech z Gruzie jsou pak myricetin, kvercetin, naringenin, kaempferol a apigenin, tedy obecně flavonoidy kromě skupiny flavanolů. Obsah flavanolů spolu se stilbeny a sinapovou kyselinou je dle analýzy významnější u českých vín. Mezi látky, které k separaci obou skupin přispívají nejméně, patří 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, salicylová kyselina, syringová kyselina, vanilová kyselina a gallová kyselina. Lze tedy říci, že odrůda, podmínky kultivace a způsob zpracování nemají až na výjimky významný vliv na obsah fenolických kyselin ve víně. Flavonoidy obsažené v gruzínských vínech souvisejí hlavně s barevností hroznů a jejich ochranou před UV zářením [14]. Flavanololy ovlivňují především chuťové vlastnosti vína a jejich obsah je ovlivněn vyzrálostí hroznů. Způsobují trpkou chuť hroznů, což může být i jeden z obranných mechanismů rostliny [6]. Lze tedy předpokládat, že slunečnější vinice a delší vegetační období, které nabízí Gruzie, jsou předpokladem těchto odlišností. Stilbeny jsou pak produkovány, když je rostlina ve stresu a to zejména, je-li napadena plísněmi [4]. Je tedy možné, že mnohaletá produkce vína na asi dříve více zamořených vinicích vedla k vyšší produkci těchto obranných látek ve vinné révě. Tuto skutečnost by bylo zajímavé sledovat také u odrůd českých bílých vín. Kde by pak bylo pravděpodobné, že by i přes odlišný způsob zpracování byla koncentrace stilbenů ve výsledném produktu vysoká.

Z Obr. 4.4 je zřejmé, že Cabernet Sauvignon z Mikulova (CZ2) se nejvíce odlišuje od českých vín a po porovnání výsledků je za to nejvíce zodpovědná kyselina kávová a dále katechin a epikatechin. Dále jsou si dle PCA blízké Rulandské modré (CZ1) a Cabernet Moravia z Čejkovic (CZ4) a také Cabernet Sauvignon z Čejkovic (CZ3) s Cabernetem Moravia z vinařství Michlovský (CZ5). Ve skupině gruzínských vín se

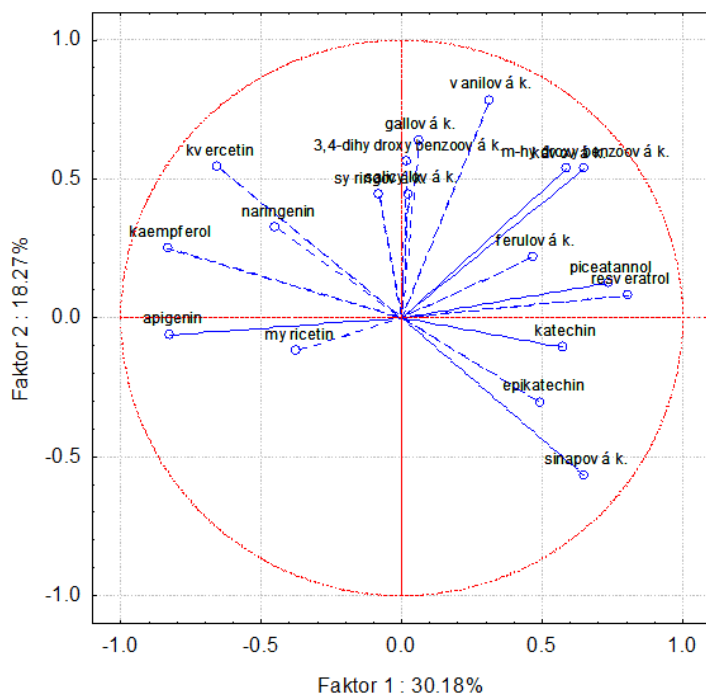
na PCA diagramu nejvíce odlišuje Saperavi z biovinářství Givi Nikolashvili (GE6) a následně i Cabernet Sauvignon (GE11) od ostatních Saperavi.

Shluková analýza (Obr. 4.6), která se liší od PCA analýzy způsobem výpočtu podobností, rozdělila vína do dvou hlavních skupin. Dá se říci, že jednu tvoří opět vína česká a druhou gruzínská. Výjimku tvoří Cabernet Sauvignon z Mikulova (CZ2), který se odchyloval i na PCA diagramu, a Saperavi z oblasti Napareuli (GE8), které bylo tentokrát přiřazeno spíše k českým vínům. Další odlišnost je v příbuznosti odrůd českých vín, která tentokrát vyšla větší mezi Cabernetu Moravia (CZ4 a CZ5) a dále mezi Rulanským modrým (CZ1) a Cabernet Sauvignonem z Čejkovic (CZ3).

PCA analýza a s jednou výjimkou také shluková analýza rozdělily vzorky vín na dvě hlavní skupiny a to podle oblasti pěstování. Vliv odrůdy tedy prokázán nebyl. Pouze odrůdy Cabernetu Moravia (CZ4 a CZ5) měly podle použitých analýz nejpodobnější obsah fenolických látek.

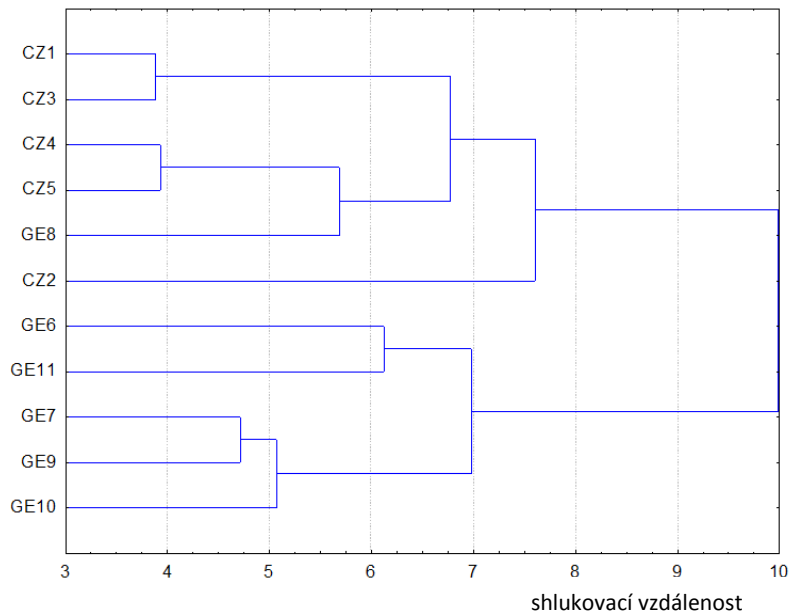


Obrázek 4.4 Analýza hlavních komponent (PCA) – diagram komponentního skóre
Červená elipsa vymezuje gruzínská vína a modrá elipsa české vzorky



Obrázek 4.5 Score plot (PCA analýza)

Vysvětlivky: nečitelné kyseliny na ose faktoru jedna jsou vlevo kyselina syringová a vpravo kyselina salicylová, nečitelné kyseliny v prvním kvadrantu jsou vlevo kyselina kávová a vpravo m-hydroxybenzová



Obrázek 4.6 Shluková analýza (dendrogram) - shlukování pomocí Wardovy metody, euklidovské vzdálenosti

5. Závěr

Podařilo se vyvinout a optimalizovat metodu pro HPLC, která je schopná separovat 27 zvolených analytů, u kterých byl předpoklad jejich zdraví prospěšných vlastností.

Z výsledků a následně i z vícerozměrných statistických analýz vyplývají rozdíly mezi českými a gruzínskými víny. Hlavními látkami zodpovědnými za tyto odlišnosti jsou stilbeny a flavonoidy. Nejvýznamnější jsou pak kvercetin a resveratrol. Neprokázala se však podobnost u stejných odrůd vinné révy. Tyto skutečnosti by bylo vhodné potvrdit hlavně analýzou většího množství vzorků stejných odrůd z různých oblastí.

Pro další analýzy v rámci projektu „Sledování diversity révy vinné na základě produkce zdraví prospěšných látek“ se pro zlepšení citlivosti detekce předpokládá vývoj metody pro GC-MS, a dále pak využití výsledků pro zhodnocení souvislostí mezi antioxidační a protizánětlivou aktivitou vína a jeho složením.

6. Literatura

1. Johnson, H.; Robinsonová, J.: *Světový atlas vína*. 2. upravené vydání Hong Kong, Knižní klub 2009
2. Šamánek, M.; Urbanová, Z.: *Pít či nepít? Pití vína a srdeční infarkt*. 1. vydání Praha, Radix 2003
3. Harmatha, J.: *Víno jako lék, v proměnách času a vědomostí*. Dostupné z URL: <http://www.majgemer.sk/images/stories/zdravie/vino/vino_jako_lek.pdf> [cit. 22.4.2012]
4. Harmatha, J.: Kvalita vína z pohledu chemika a sommeliéra. In: *Sborník konference - Víno jako multikulturní fenomén*. Olomouc: Filozofická fakulta UP, vydání na CD, 2009
5. Harmatha, J.: Chemické faktory ovlivňující chuť a léčivý účinek vína. In: *Sborník konference - Víno jako multikulturní fenomén*. Olomouc: Filozofická fakulta UP, vydání on-line, 2010. Dostupné z URL: <http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/FF-katedry/kae/Vino_2010.pdf> [cit. 22.4.2012]
6. Farkaš, J.: *Technologie a biochemie vína*. 2. přepracované a doplněné vydání Praha, SNTL/Alfa 1980
7. Národní vinařské centrum: *Vína z Moravy vína z Čech*. Dostupné z URL: <<http://www.wineofczechrepublic.cz/>> [cit. 22.4.2012]
8. Kučera, T.: Vinařství v Gruzii vstává z popela. *Lidé a země* **09** 96–103 (2011)
9. Georgian Wine Import: *Georgian Vineyards*. Dostupné z URL: <http://www.gwineimports.com/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=71> [cit. 22.4.2012]
10. Pascual-Teresa, S.; Moreno, A. D.; García-Viguera, C.: Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 1679–1703 (2010)
11. Šeruga, M.; Novak, I.; Jakobek, L.: Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltametry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* **124**, 1208–1216 (2011)
12. Trna, J.; Tábořská, E.: *Přírodní polyfenolové antioxidanty*. Dostupné z URL: <<http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>> [cit. 22.4.2012]

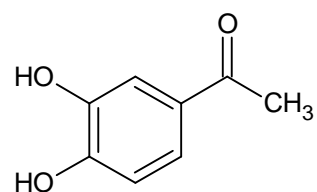
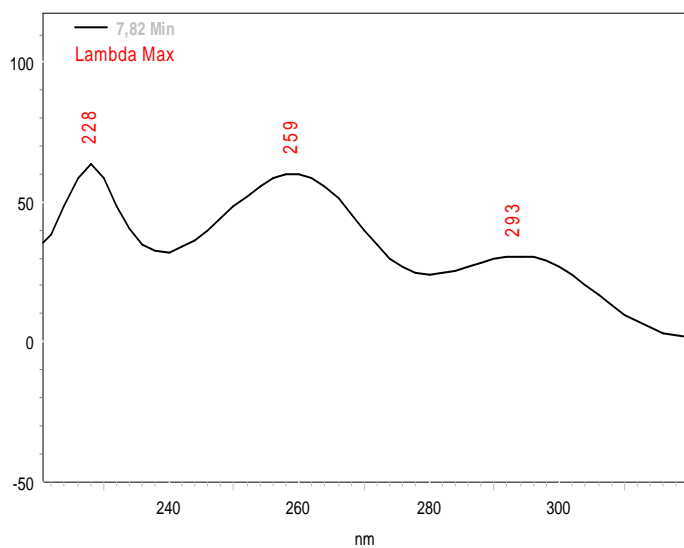
13. Robbins, J. R.; Bean, S. R.: Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A* **1038**, 97–105 (2004)
14. Calwineries Inc.: *Wine and health*. Dostupné z URL: <<http://www.calwineries.com/learn/wine-and-health>> [cit. 22.4.2012]
15. Fortes Gris, E.; Mattivi, F.; Ferreira, E. A.; Vrhovsek, U.; Curi Pedrosa, R.; Bordignon-Luiz, M. T.: Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry* **126**, 213–220 (2011)
16. Lucena, A. P. S.; Nascimento, R. J. B.; Maciel, J. A. C.; Tavares, J. X.; Barbosa-Filho, J. M.; Oliveira, E. J.: Antioxidant activity and phenolic content of selected Brazilian wines. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**, 30–36 (2010)
17. Rodríguez-Delgado, M. A.; Malovaná, S.; Pérez, J. P.; Borgis, T.; García Montelongo, F.J.: Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* **912**, 249–257 (2001)
18. Malovaná, S.; García Montelongo, F. J.; Pérez, J. P.; Rodríguez-Delgado, M. A.: Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **428**, 245–253 (2001)
19. Teliany valley: *Wines*. Dostupné z URL: <http://www.telianivalley.com/index.php?option=com_telianiwines&view=winewineslist¶m=red_type&subcat=1&Itemid=8&lang=en> [cit. 5.5.2012]
20. Woraratphoka, J.; Intarapichet, K.-O.; Indrapichate, K.: Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chemistry* **104**, 1485–1490 (2007)
21. Pour Nikfardjam, M. S.; László, M.; Avar, P.; Figler, M.; Ohmacht, R.: Polyphenols, anthocyanins, and *trans*-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chemistry* **98**, 453–462 (2006)

Přílohy

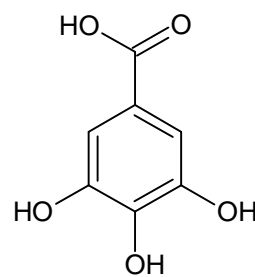
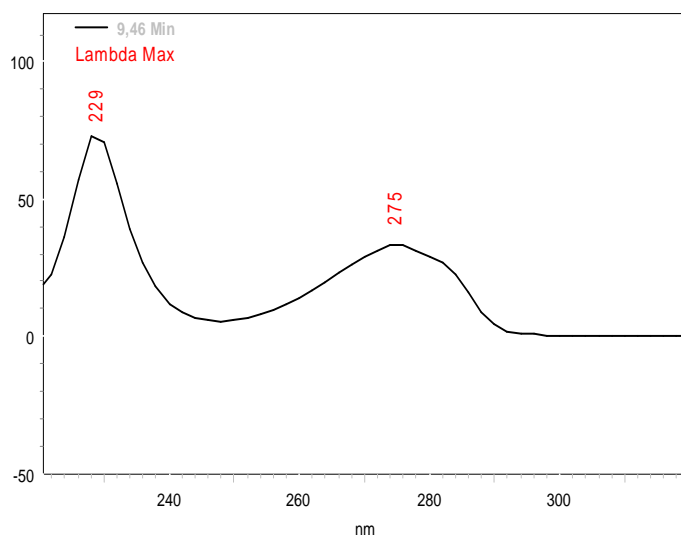
Absorpční spektra standardů

- seřazeno dle retenčních časů standardů

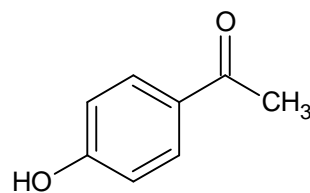
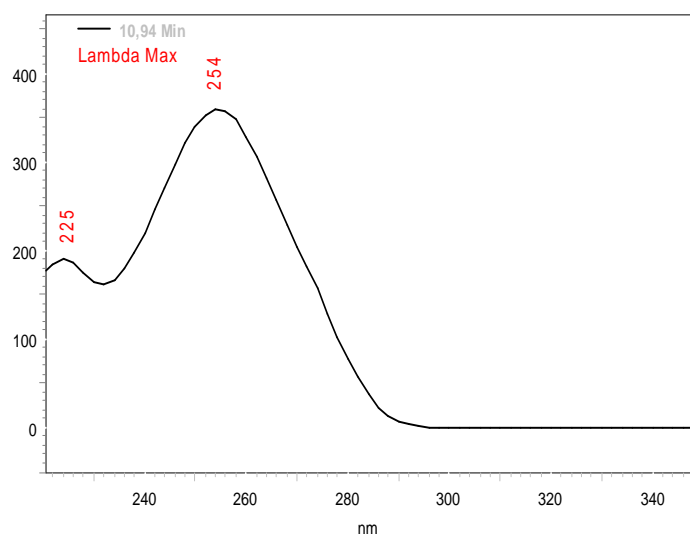
1. kyselina 3,4-dihydroxybenzoová



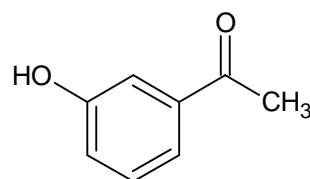
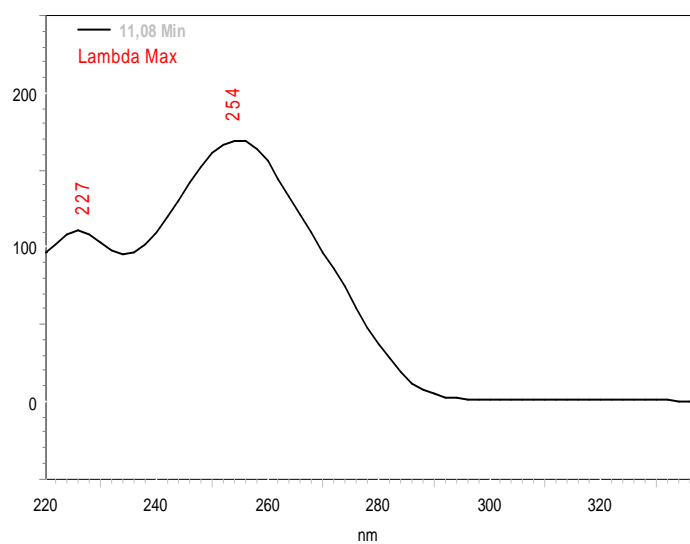
2. kyselina gallová



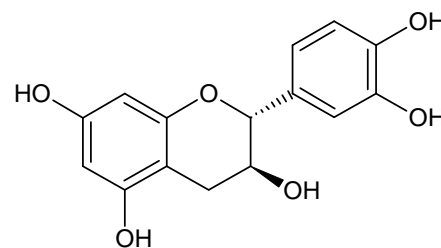
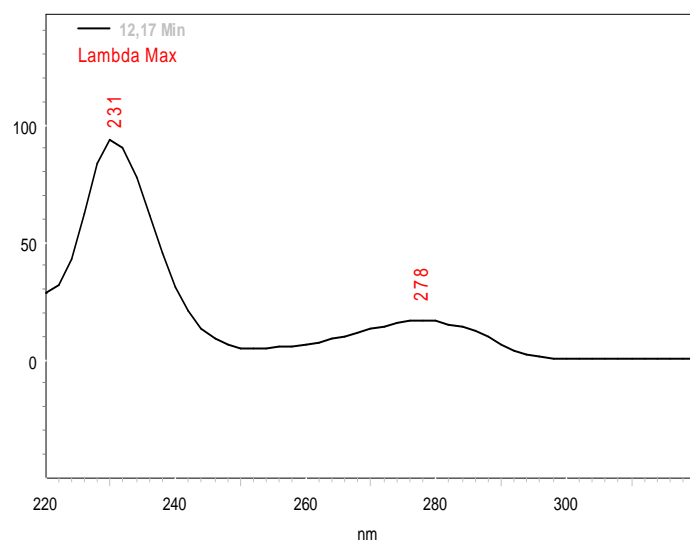
3. kyselina p-hydroxybenzoová



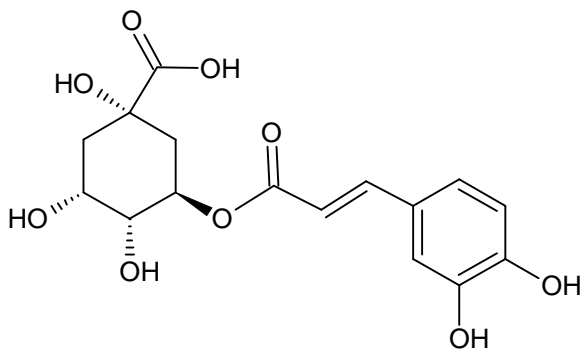
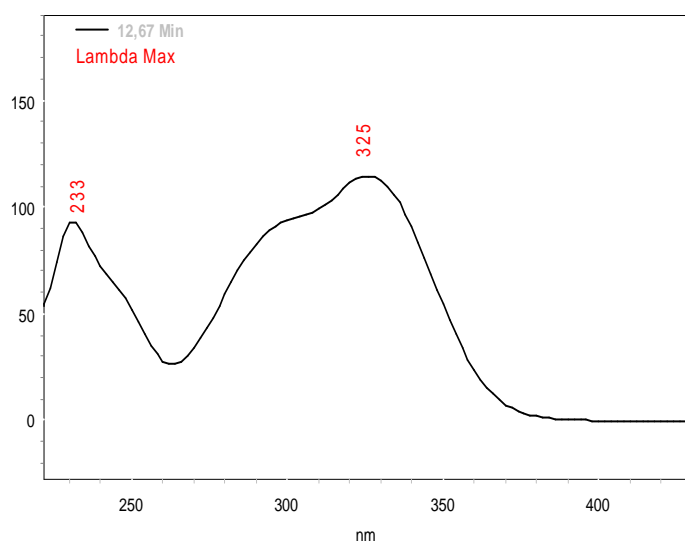
4. kyselina m-hydroxybenzoová



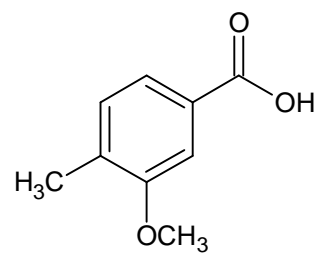
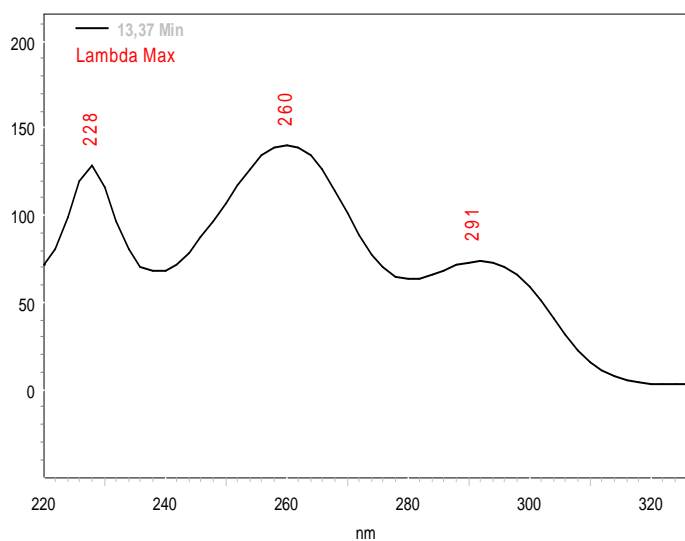
5. katechin



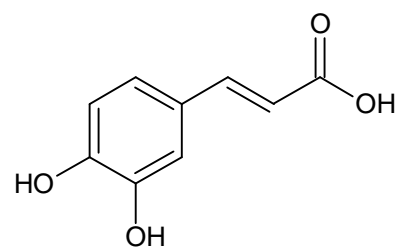
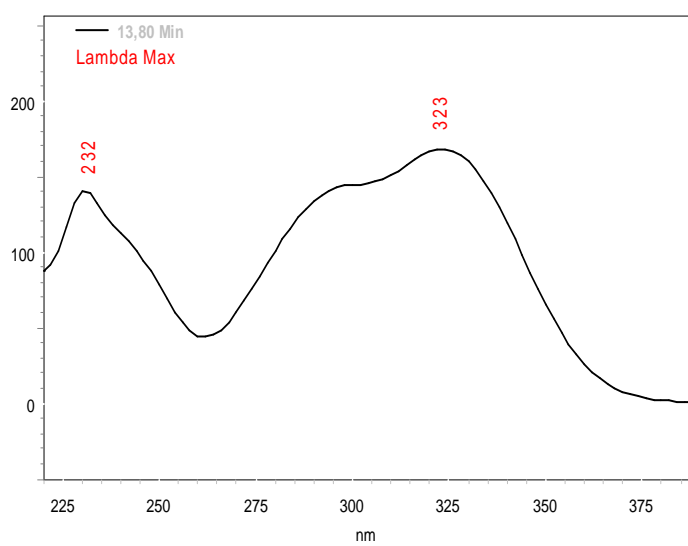
6. kyselina chlorogenová



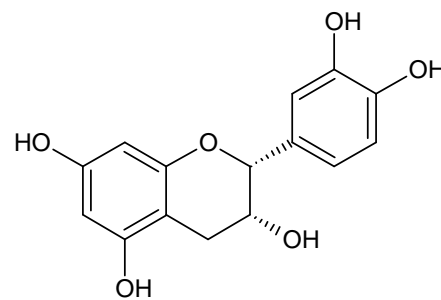
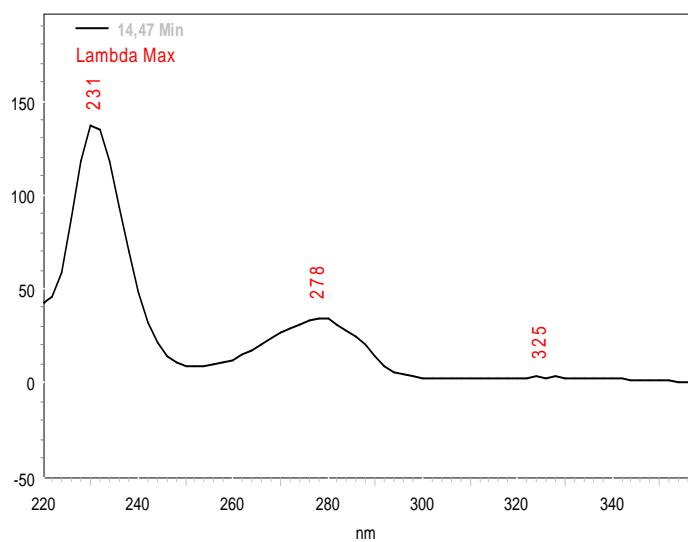
7. kyselina vanilová



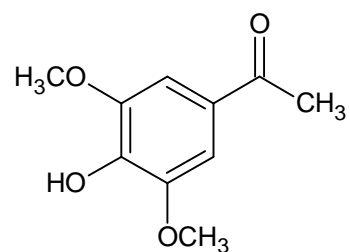
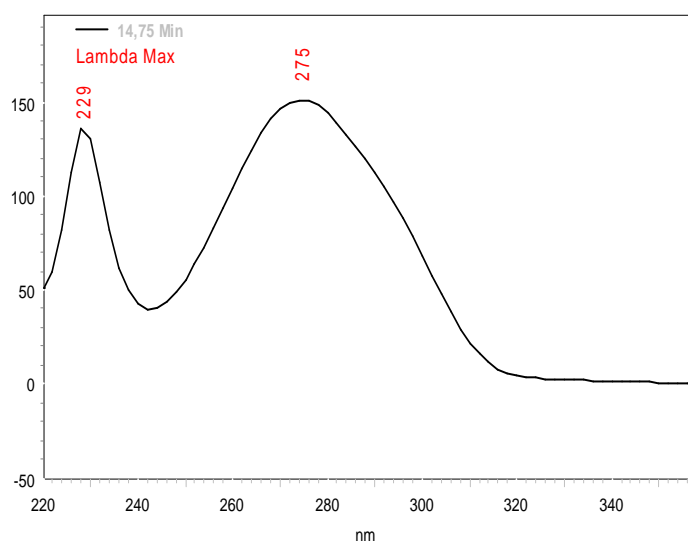
8. kyselina kávová



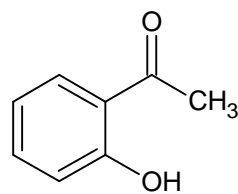
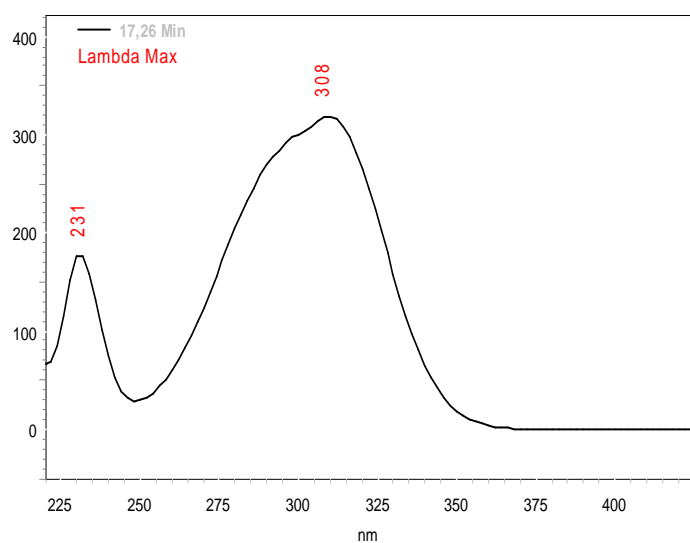
9. epikatechin



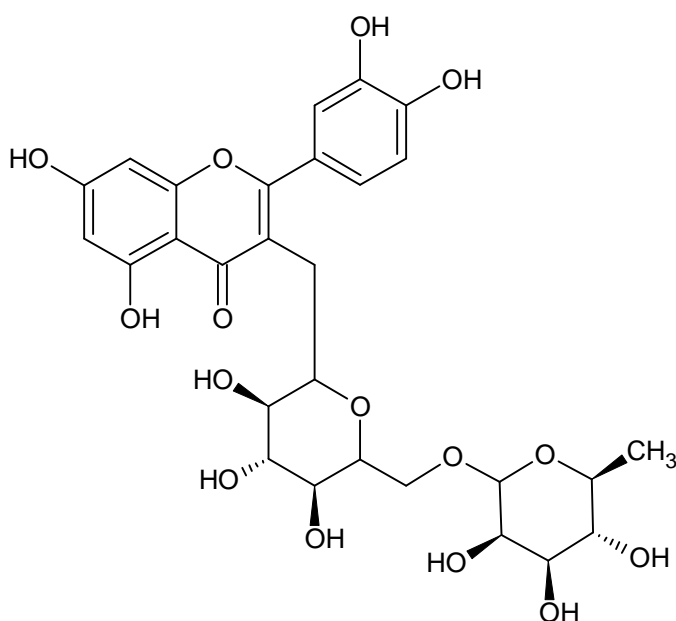
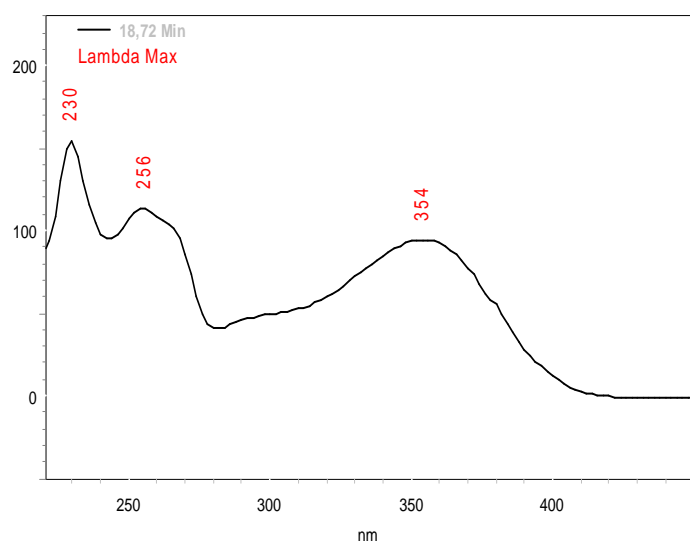
10. kyselina syringová



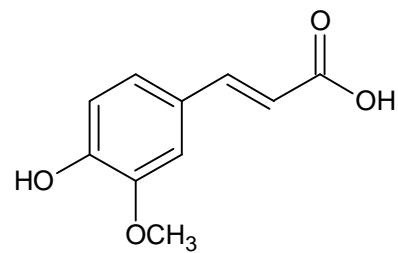
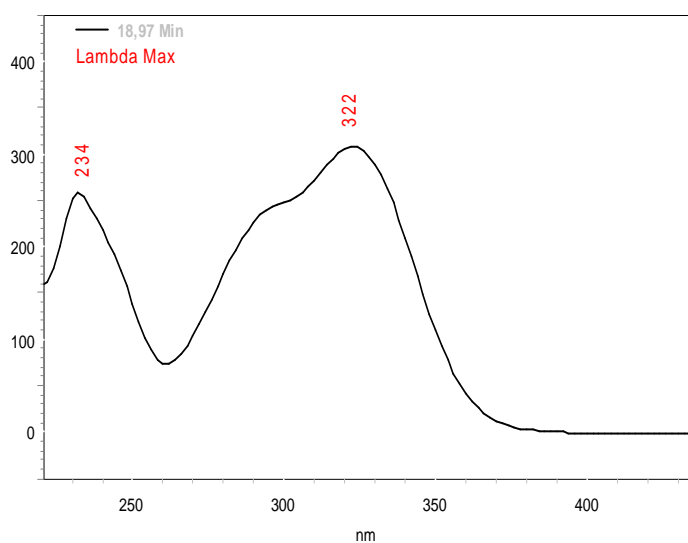
11. kyselina salicylová



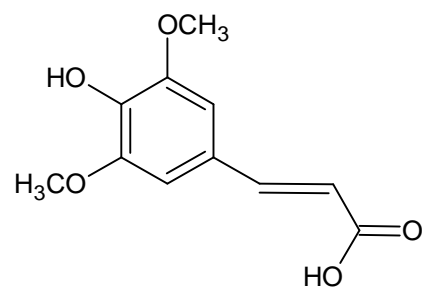
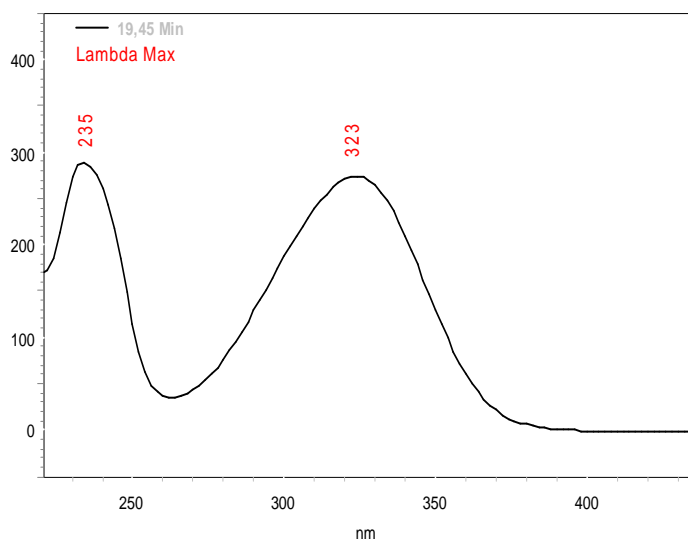
12. rutin



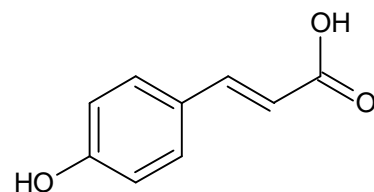
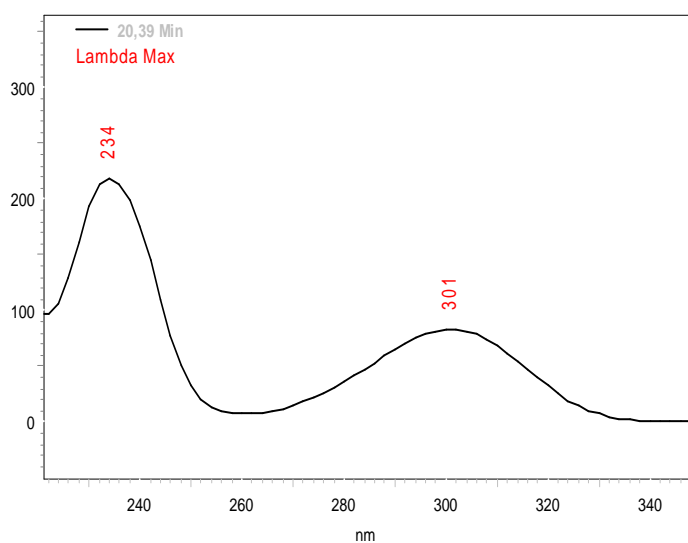
13. kyselina ferulová



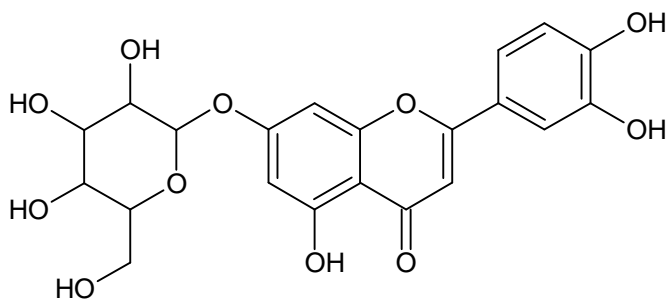
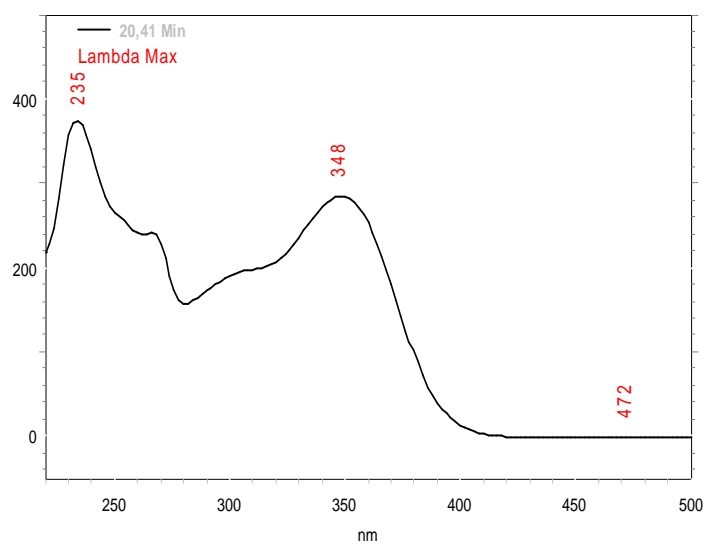
14. kyselina sinapová



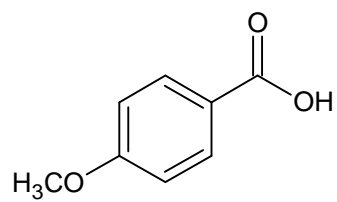
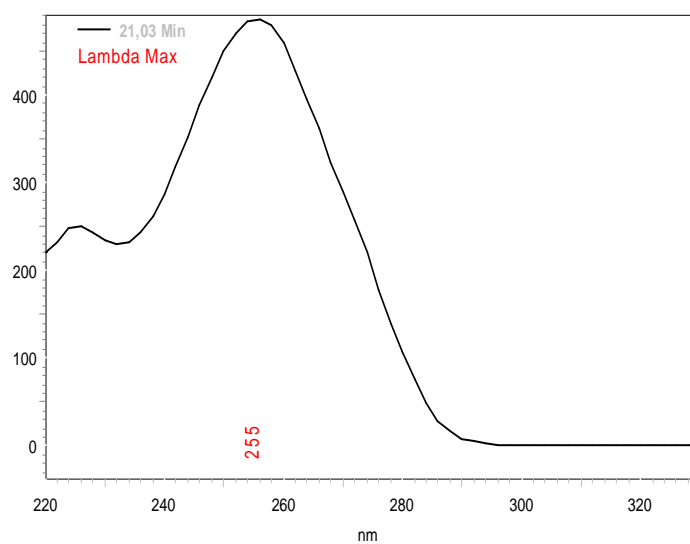
15. kyselina kumarová



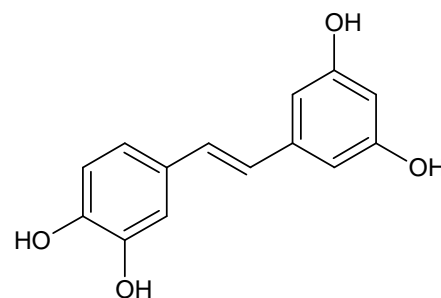
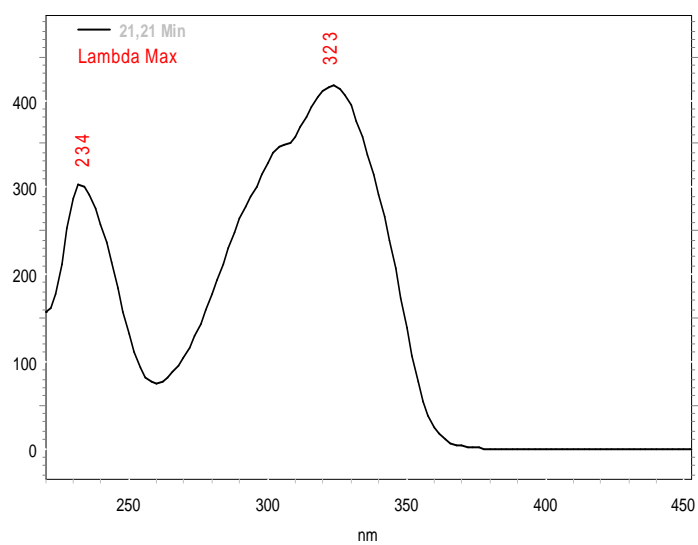
16. luteolin-7-glukosid



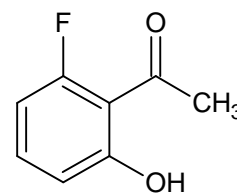
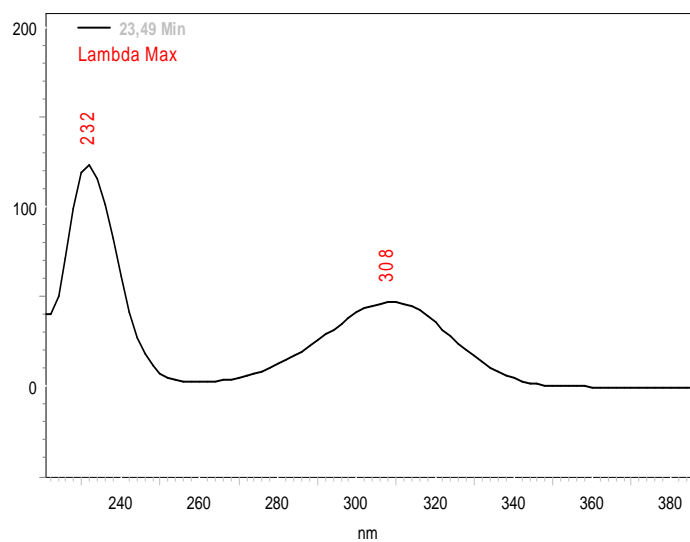
17. kyselina anisová



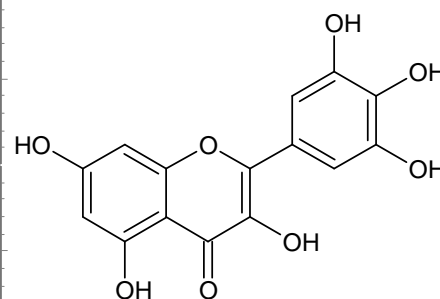
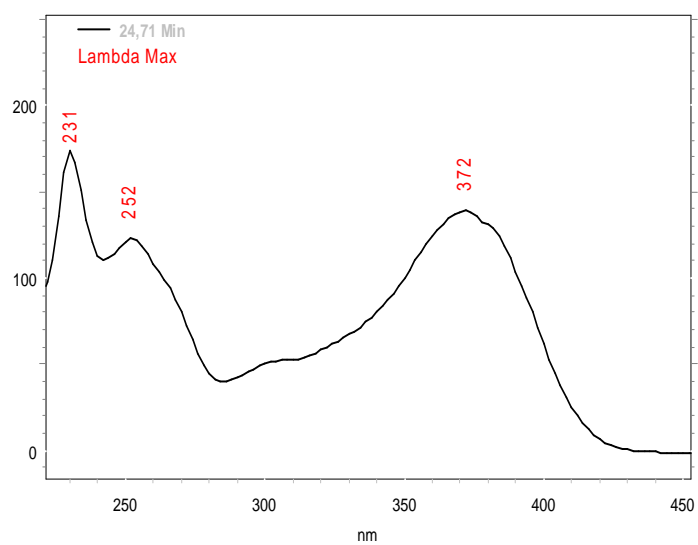
18. piceattanol



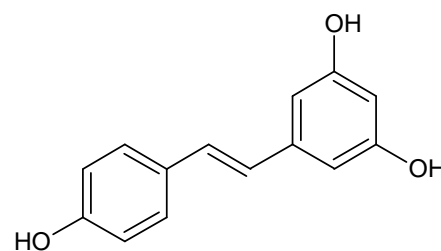
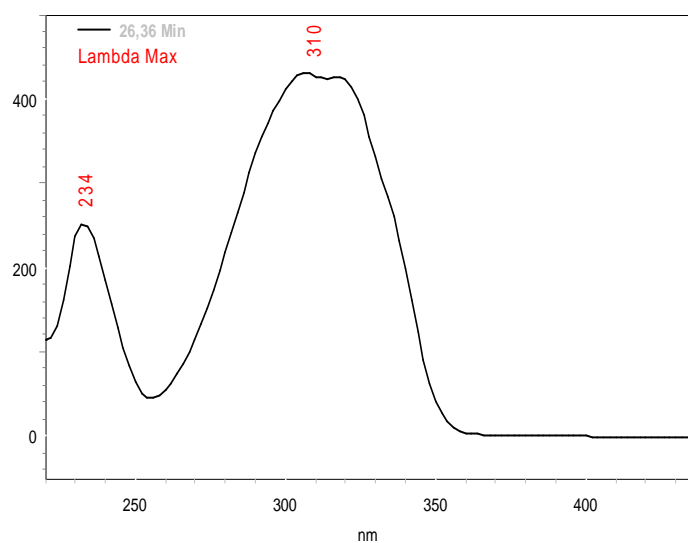
19. kyselina fluorsalicylová



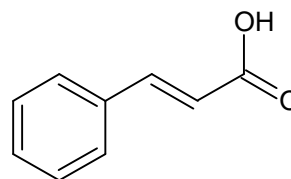
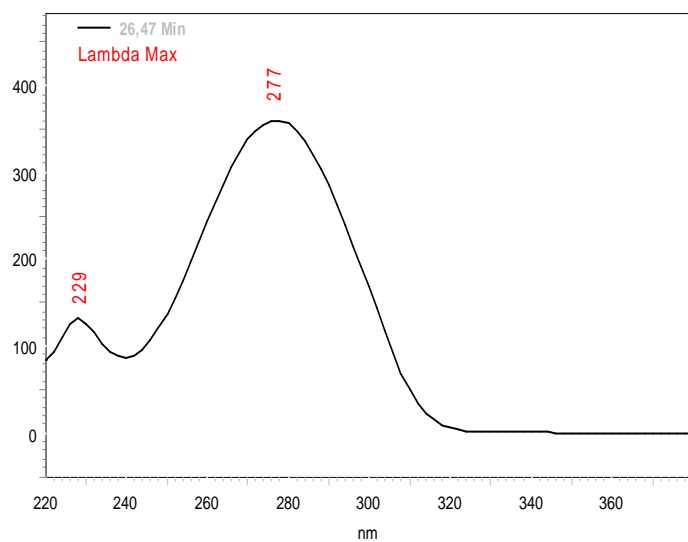
20. myricetin



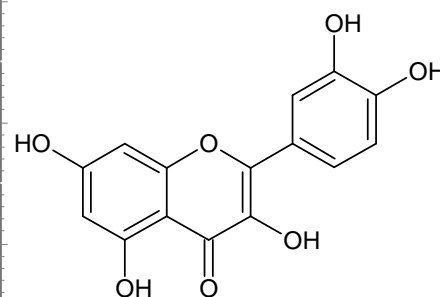
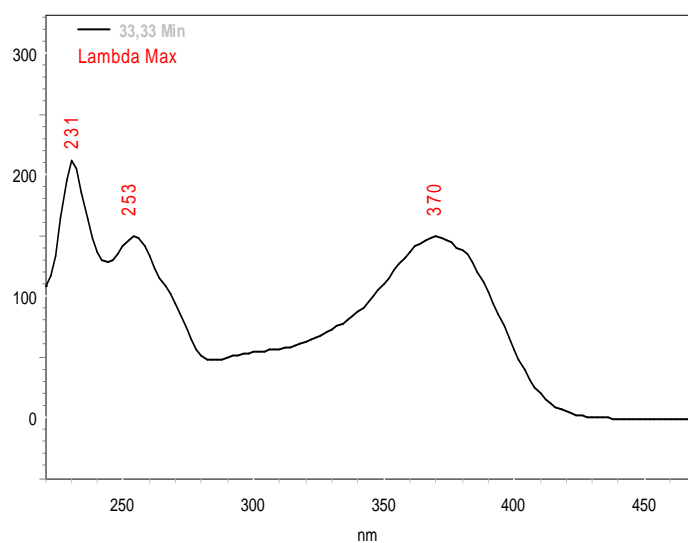
21. resveratrol



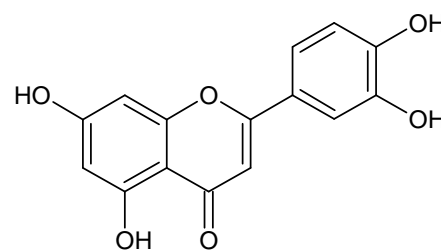
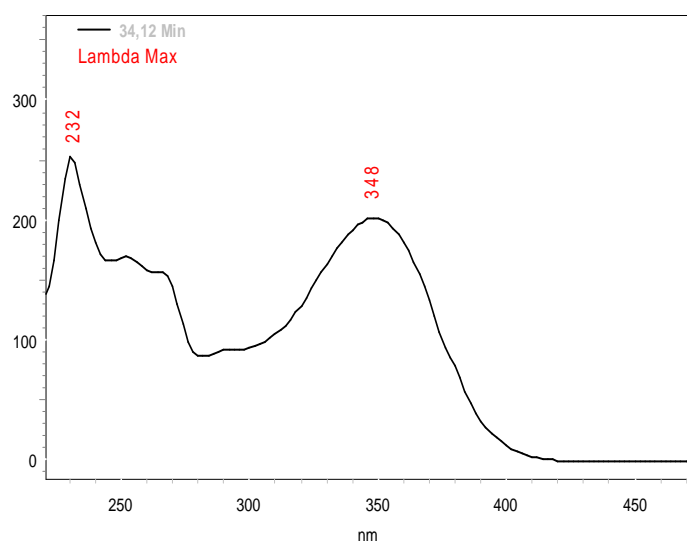
22. kyselina skořicová



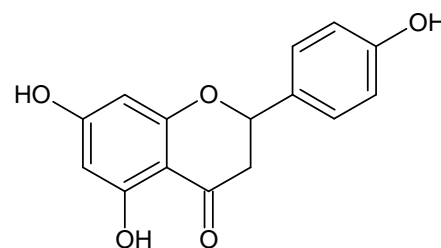
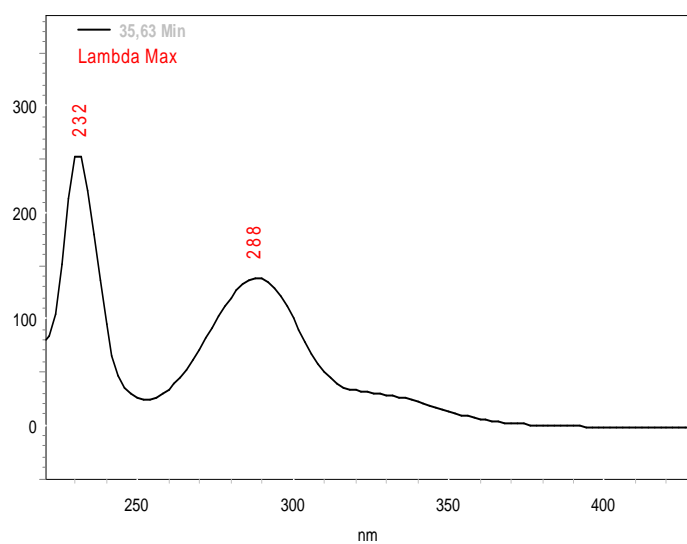
23. kvercetin



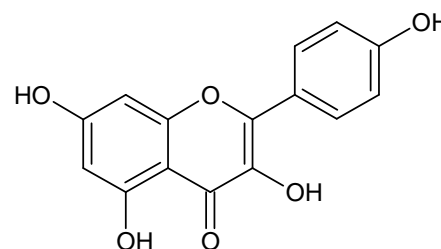
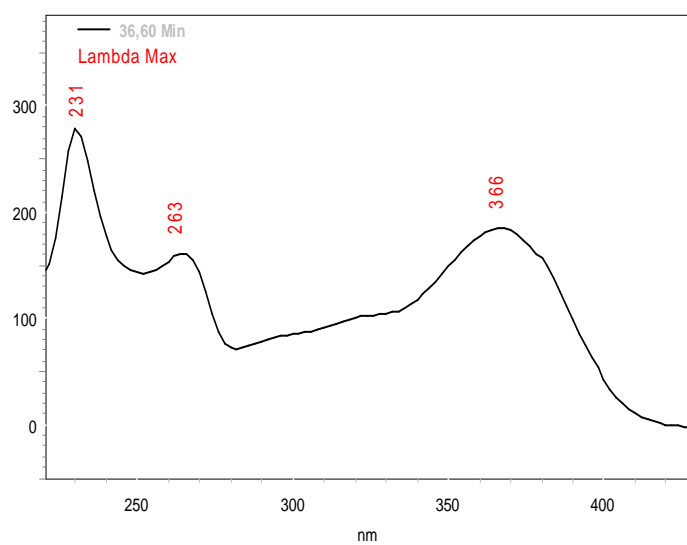
24. luteolin



25. naringenin



26. kaempferol



27. apigenin

